

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 7 月 5 日 (05.07.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/48014 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 14/47, (SHIMIZU, Shigeomi) [JP/JP]: 〒553-0003 大阪府
C12N 15/12, A61K 38/17, A61P 9/10 大阪市福島区福島 3-7-39-307 Osaka (JP). 辻本 賢英
(TSUJIMOTO, Yoshihide) [JP/JP]: 〒560-0002 大阪府
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/09274 豊中市緑丘 3-20-6 Osaka (JP).
- (22) 国際出願日: 2000 年 12 月 26 日 (26.12.2000) (74) 代理人: 弁理士 細田 芳徳 (HOSODA, Yoshinori): 〒
540-0012 大阪府大阪市中央区谷町二丁目 8 番 1 号 大
(25) 国際出願の言語: 日本語 手前 M2 ビル 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 / 国内: CA, JP, US.
- (30) 優先権データ: (84) 指定国 / 広域: ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
特願平 11 371449 DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
1999 年 12 月 27 日 (27.12.1999) JP
- (71) 出願人 / 米国を除く全ての指定国について: 塩野義
製薬株式会社 (SHIONOGI & CO., LTD.) [JP/JP]: 〒
541-0045 大阪府大阪市中央区道修町三丁目 1 番 8 号
Osaka (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受
領の際には再公開される。
- (72) 発明者: および
(75) 発明者 / 出願人 / 米国についてののみ: 清水 重臣
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: BH4-FUSED POLYPEPTIDES

(54) 発明の名称: BH4 融合ポリペプチド

(57) Abstract: BH4-fused polypeptides which contain the amino acid sequence of a polypeptide capable of exerting an effect of enabling uptake into cells or a derivative sequence thereof, and an amino acid sequence selected from the group consisting of: (A) amino acid sequences at least containing the BH4 domain sequence (SEQ ID NO:1) of an anti-apoptosis Bcl-2 family protein, (B) amino acid sequences derived from the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 by substitution, deletion or insertion of at least one amino acid residue, and (C) amino acid sequences having a sequence homology of at least 50% with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, and are capable of inhibiting apoptosis; apoptosis inhibitors containing these BH4-fused proteins; a method of treating ischemic diseases which comprises administering these apoptosis inhibitors to patients with ischemic diseases to thereby inhibit apoptosis and treat the ischemic diseases; and use of the BH4-fused proteins for producing preventives or remedies for ischemic diseases. Thus, apoptosis can be efficiently inhibited and it is expected that the BH4-fused proteins are applicable to remedies for AIDS, neurodegenerative diseases, myelodysplastic diseases, ischemic diseases, infective multiple failure, fulminant hepatitis, diabetes, etc.

[続葉有]

WO 01/48014 A1



(57) 要約:

細胞への取り込み作用を発揮しうるポリペプチドのアミノ酸配列またはその誘導体配列と、(A) 少なくともアンチアポトーシス性 Bcl-2 ファミリータンパク質の BH4 ドメインの配列 (配列番号: 1) を含有するアミノ酸配列、(B) 配列番号: 1 に示されるアミノ酸配列中、少なくとも 1 残基のアミノ酸の置換、欠失もしくは挿入を有するアミノ酸配列、および (C) 配列番号: 1 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 50% の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる群より選択されたアミノ酸配列とを含有し、かつアポトーシスを抑制しうる BH4 融合ポリペプチド; 該 BH4 融合ポリペプチドを含有したアポトーシス抑制剤; 該アポトーシス抑制剤を虚血性疾患患者に投与してアポトーシスを抑制し、それにより虚血性疾患を治療することを特徴とする、虚血性疾患の治療方法; 虚血性疾患の予防または治療剤を製造するための、該 BH4 融合ポリペプチドの使用。本発明により、効率よくアポトーシスを抑制することができ、AIDS、神経変性疾患、骨髄異形成疾患、虚血性疾患、感染性多臓器不全、劇症肝炎、糖尿病などの治療剤としての応用が期待される。

明細書

BH4 融合ポリペプチド

技術分野

本発明は、アポトーシスを抑制しうるBH4 融合ポリペプチドおよびその使用、アポトーシス抑制剤ならびに虚血性疾患の治療方法に関する。詳しくは、細胞への取り込み作用を有し、かつアポトーシスを抑制しうるBH4 融合ポリペプチドおよびその使用、該融合ポリペプチドを含有したアポトーシス抑制剤ならびに虚血性疾患の治療方法に関する。BH4 融合ポリペプチドは、AIDS、神経変性疾患、骨髄異形成疾患、虚血性疾患、感染性多臓器不全、劇症肝炎、虚血性再灌流障害、糖尿病などの治療剤として有用である。

背景技術

細胞死は、生体内の臓器、組織などの細胞動態に重要な役割を果たしている。かかる細胞死の多くは、アポトーシスにより進行し、該アポトーシスの機構は、通常厳密に制御されている。前記アポトーシスは、病理的要因によっても引き起こされる。

近年、アポトーシスに関わる多くの分子が同定され、アポトーシスのシグナル伝達機構が調べられている。例えば、Bcl-2タンパク質やBcl-x_Lタンパク質は、アポトーシス誘導に必須なプロテアーゼであるカスベースの上流でアポトーシスシグナル伝達を抑制的に調節し、カスベースファミリーは、該シグナルのメディエーターとして作用することが示唆されている。

前記Bcl-2タンパク質は、ミトコンドリア膜電位($\Delta\Psi$)の低下、シトクロムcの漏出およびアポトーシス誘導因子(以下、AIFという)の漏出を抑制することにより、アポトーシスを抑制しうると考えられている。前記Bcl-2

タンパク質は、癌遺伝子の1つとして辻本らにより発見されたbcl-2遺伝子〔Tsujimoto, Y. et al., Science, 228:1440-1443 (1985)〕の発現産物である。

最近、①Bcl-2ファミリータンパク質は、電位依存陰イオンチャネル(VDAC)がシトクロムcのアポトーシス性の漏出を調節することを直接標的とすること、②アンチアポトーシス性因子が該チャネルを抑制するが、Bax、Bakなどのプロアポトーシス性因子がVDAC活性を刺激してシトクロムcの通過を可能にすること、および③VDACは、アポトーシス性の $\Delta\Psi$ のロスを生じさせることに必要とされることが示唆されている。前記VDACは、ミトコンドリア外層膜に豊富であり、ミトコンドリア膜透過性を調節する機能を有し、アデニンヌクレオチドトランスロケーター(ANT)と他の分子とを伴い透過性遷移ポアを構成する。

前記したように、Bcl-2ファミリータンパク質は、シトクロムcの漏出の抑制、 $\Delta\Psi$ のロスの抑制など様々な関与が示唆されるが、その詳細な作用機構などは不明な点が多いのが現状である。

また、Bcl-2ファミリータンパク質をそのままの状態で用いる場合、タンパク質が大きくなり分解されやすいという欠点を有し、また、生産効率が低下する場合もある。

発明の開示

本発明は、アポトーシスを効率よく抑制しうるBH4融合ポリペプチドおよびその使用、アポトーシス抑制剤、虚血性疾患の治療方法を提供することを目的とする。

本発明は、

(1) 細胞への取り込み作用を発揮しうるポリペプチドのアミノ酸配列またはその誘導体配列と、

- (A) 少なくともアンチアポトーシス性 B c 1 - 2 ファミリータンパク質の B H 4 ドメインの配列 (配列番号: 1) を含有するアミノ酸配列、
- (B) 配列番号: 1 に示されるアミノ酸配列において、少なくとも 1 残基のアミノ酸の置換、欠失もしくは挿入を有するアミノ酸配列、および
- (C) 配列番号: 1 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 50% の配列同一性を有するアミノ酸配列
- からなる群より選択されたアミノ酸配列とを含有してなり、かつアポトーシスを抑制しうる B H 4 融合ポリペプチド、
- 〔2〕 前記〔1〕記載の B H 4 融合ポリペプチドをコードしてなる DNA、
- 〔3〕 前記〔1〕記載の B H 4 融合ポリペプチドを含有してなるアポトーシス抑制剤、
- 〔4〕 前記〔3〕記載のアポトーシス抑制剤を虚血性疾患患者に投与してアポトーシスを抑制し、それにより虚血性疾患を治療することを特徴とする、虚血性疾患の治療方法、ならびに
- 〔5〕 虚血性疾患の予防または治療剤を製造するための、前記〔1〕記載の B H 4 融合ポリペプチドの使用、
- に関する。

図面の簡単な説明

第 1 図は、B c 1 - x_L および Δ 2 1 の一過的な発現の V P 1 6 により誘導されたアポトーシスへの影響を調べた結果を示す図である。H e L a 細胞は、(D N A トランスフェクト細胞の検出のための) 0. 1 μ g の G F P 発現構築物と共に、B c 1 - x_L (○)、Δ 2 1 (■) またはベクターのみ (□) のそれぞれの発現構築物で 24 時間トランスフェクトした。示された濃度で 24 時間 V P 1 6 によりトランスフェクト細胞を処理し、ついで処理後の細胞を H o e c h s t 3 3 3 4 2 で染色した。全 G F P 陽性細胞中の核断片化を伴う G F P 陽性細胞の

割合として、アポトーシス性の細胞死を決定した。データは、3回の独立した実験の結果の1つを示す。

第2図は、フローサイトメトリーによる、Bcl-x_L発現HeLa細胞およびΔ21発現HeLa細胞の分類を調べた結果を示す図である。HeLa細胞はDAF発現プラスミドと共にBcl-x_L、Δ21またはベクター単独の発現産物で24時間トランスフェクトした。ついで細胞を抗ヒトDAF抗体で染色し、DAF陽性細胞をフローサイトメトリーで分取した。分取された細胞によるDAF（上段パネル）の発現またはBcl-x_Lタンパク質およびΔ21タンパク質（下段パネル）をフローサイトメトリーを用いて解析した。点線はBcl-x_L発現細胞を示し、実線はΔ21発現細胞を示す。DNAでトランスフェクトされていない細胞を黒塗りの領域で示す。データは、3回の独立した実験の代表的な結果を示す。

第3図は、Bcl-x_LまたはΔ21によるアポトーシスシトクロムc漏出への影響を調べた結果を示す図である。示された時間、200 μM VP16により第2図と同様に分取されたDAF陽性細胞を処理し、ついで生化学的細胞分画の後、ウェスタンブロット解析によりシトクロムc漏出を決定した。データは、3回の独立した実験の結果の1つを示す。

第4図は、Ca²⁺誘導のΔΨロスおよび単離ミトコンドリアからのシトクロムc漏出の抑制に対するBcl-x_LのBH4ドメインの役割を調べた結果を示す図である。パネル(A)は、ラット肝臓ミトコンドリア(1 mg/ml)を40 μM Ca²⁺と共に、20 μg/mlのrBcl-x_L、rΔ21または模擬タンパク質で処理し、Rh123を用いてΔΨを調べた結果を示し、パネル(B)は、インキュベーション15分後の上清画分(sup)およびミトコンドリア画分(pt)におけるシトクロムcレベルを調べた結果を示す。データは、3回の独立した実験の結果の1つを示す。「トータル」は、1% Triton-X100によるシトクロムc漏出の総量を示す。

第5図は、Bcl-x_L および $\Delta 21$ のVDACとの直接相互作用を調べた結果を示す図である。精製ラット肝臓VDAC (20 μ g/ml) をrBcl-x_L タンパク質 (20 μ g/ml) およびr $\Delta 21$ タンパク質 (20 μ g/ml) とインキュベートした。試料を抗Bcl-x_L 抗体、L19 (α -Bcl-x_L) および正常ウサギIgG (IgG) と免疫沈降させた。ついで、免疫沈降物を抗VDAC抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。「トータル」は、用いられたVDACの総量を示す。

第6図は、VDACリボソームによるスクロース取り込みを調べた結果を示す図である。清水らの既報 [Nature, 399, 483-487 (1999)] の記載に従い、VDACを含有しないリボソーム、VDACリボソームおよび熱変性VDACリボソーム (加熱VDACリボソーム) を50 mMスクロースとインキュベートした。リボソーム膨潤を520 nmの波長で分光光度計を用いて光散乱の減少により連続的にモニターした。

第7図は、 $\Delta 21$ のVDAC活性抑制に対する影響を調べた結果を示す図である。左パネルは、VDACリボソームを20 μ g/mlのrBcl-x_L、r $\Delta 21$ および模擬タンパク質と共に50 mMスクロースとインキュベートした。光散乱は、第6図と同様にモニターした。右パネルは、 $\Delta 21$ のVDAC活性抑制に対するタンパク質濃度の影響を調べた結果を示す図である。VDACリボソームを示された濃度でrBcl-x_L (黒カラム)、r $\Delta 21$ (白カラム) と共に50 mMスクロースとインキュベートした。開始時の値 (時間0) から10分経過時の光散乱の差異 (Δ 光散乱) を示す。

第8図は、VDACリボソームへの¹⁴C-スクロースの取り込みへのBcl-x_L の影響を調べた結果を示す図である。清水らの既報 [Nature, 399, 483-487 (1999)] の記載に従い、20 μ g/mlのrBcl-x_L 若しくはr $\Delta 21$ の存在または非存在下にVDACを含有しないリボソーム、熱変性VDACリボソーム (加熱) およびVDACリボソームを¹⁴C-スクー

コース ($2 \mu\text{Ci}$) と 10 分間インキュベートした。遠心濾過後、リボソームを回収し、2% SDS に溶解した。ついで、リボソームにおける ^{14}C -スクロース放射活性をカウントした。

第 9 図は、BH4 ポリペプチドによる VDAC 活性の抑制を調べた結果を示す図である。VDAC リボソームを示された濃度の Bc1-xL BH4 ポリペプチドと共に 50 mM スクロースとインキュベートし、光散乱を測定した。

第 10 図は、種々の BH4 ポリペプチドによる VDAC 活性の抑制を調べた結果を示す図である。VDAC リボソームを $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ の Bc1-2 BH4 ポリペプチド、Bc1-xL BH4 ポリペプチドまたは Bak 推定 BH4 ポリペプチドと共にスクロースとインキュベートし、光散乱を測定した。

第 11 図は、Bc1-xL BH4 ポリペプチドによる VDAC 活性の Bax 誘導促進の抑制を調べた結果を示す図である。VDAC リボソームを $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の rBax および示された濃度の Bc1-xL BH4 ポリペプチドの存在下または非存在下に 50 mM スクロースとインキュベートし、光散乱を測定した。開始時の値 (時間 0) から 10 分経過時の光散乱の差異 (Δ 光散乱) を示す。

第 12 図は、Bc1-xL N 末端断片または C 末端断片と VDAC 間の相互作用を示す図である。ミトコンドリア ($1 \text{mg}/\text{ml}$) を Bc1-xL N 末端 (アミノ酸番号: 2-19) ポリペプチド ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) および Bc1-xL C 末端 (アミノ酸番号: 193-212) ポリペプチド ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) と 5 分間インキュベートした。ミトコンドリアライゼートを抗 Bc1-xL 抗体 (S18) (α -NBc1-xL、アミノ酸番号: 2-19 に対応する抗体) および L19 抗体 (α -CBc1-xL、アミノ酸番号: 193-212 に対応する抗体) による免疫沈降に供した。正常ウサギ IgG (IgG) を対照として用いた。抗 VDAC 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより免疫沈降物を解析した。

第 13 図は、変異体 Bc1-xL BH4 ポリペプチドのアミノ酸配列を示す

図である。図中、置換残基を黒塗りで示す。

第14図は、変異体BH4ポリペプチドのVDAC活性抑制能を調べた結果を示す図である。VDACリポソームを50mM スクロースと共に20 μ g/mlのBcl-xL BH4ポリペプチドまたは示された変異体ポリペプチドとインキュベートし、ついで光散乱を測定した。左パネルは、光散乱を連続的に測定した結果を示す。右パネルは、開始時の値（時間0）から10分経過時の光散乱の差異（ Δ 光散乱）を示す。

第15図は、Ca²⁺誘導されたミトコンドリアの $\Delta\Psi$ ロスのBH4ポリペプチドによる抑制を調べた結果を示す図である。左パネルは、単離ミトコンドリア（1mg/ml）を40 μ M Ca²⁺の存在下に20 μ g/mlのBcl-xL BH4ポリペプチドとインキュベートし、ローダミン123強度を連続的にモニターした結果を示す。右パネルは、単離ミトコンドリア（1mg/ml）を40 μ M Ca²⁺の存在下に20 μ g/mlのBcl-xL BH4ポリペプチドおよび種々の変異体ポリペプチドを15分間インキュベートして、ローダミン123強度を用いて $\Delta\Psi$ を測定した結果を示す。

第16図は、TAT-BH4ポリペプチドの存在または非存在下にVP16で処理したHeLa細胞の代表例を示す図である。示された濃度のTAT-BH4ポリペプチドの存在下にHeLa細胞を200 μ M VP16で示された時間処理した。ついで、光位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡それぞれにより、細胞形態（上段パネル）およびポリペプチドの細胞内蓄積（下段パネル）を調べた。

第17図は、TAT-BH4ポリペプチドのVP16誘導アポトーシスへの影響を調べた結果を示す図である。100 μ g/mlのTAT-BH4ポリペプチド（□）、TATポリペプチド（○）の存在下またはポリペプチドの非存在下（●）に示された濃度のVP16で24時間処理し、ついでHoechst 33342で染色した。蛍光顕微鏡を用いて核形態によりアポトーシス細胞死を決定した。データは、3回の独立した実験の結果の1つを示す。

第18図は、VP16誘導アポトーシスのTAT-BH4ポリペプチドによる投与量依存的抑制を調べた結果を示す図である。示された濃度のTAT-BH4ポリペプチド(□)またはTATポリペプチド(○)の存在下に200 μ M VP16で24時間HeLa細胞を処理した。アポトーシス細胞死を第17図と同様に決定した。

発明を実施するための最良の形態

本発明のBH4融合ポリペプチドは、細胞への取り込み作用を発揮しうるポリペプチドのアミノ酸配列またはその誘導体配列と、

(A) 少なくともアンチアポトーシス性Bcl-2ファミリータンパク質のBH4ドメインの配列(配列番号:1)を含有するアミノ酸配列、

(B) 配列番号:1に示されるアミノ酸配列において、少なくとも1残基のアミノ酸の置換、欠失もしくは挿入を有するアミノ酸配列、および

(C) 配列番号:1に示されるアミノ酸配列と少なくとも50%の配列同一性を有するアミノ酸配列

からなる群より選択されたアミノ酸配列とを含有してなり、かつアポトーシスを抑制しうることを1つの大きな特徴とする。

本発明のBH4融合ポリペプチドは、アポトーシスを抑制するための最小単位、すなわち、(A) 少なくともアンチアポトーシス性Bcl-2ファミリータンパク質のBH4ドメインの配列(配列番号:1)を含有するアミノ酸配列、

(B) 配列番号:1に示されるアミノ酸配列において、少なくとも1残基のアミノ酸の置換、欠失もしくは挿入を有するアミノ酸配列、および

(C) 配列番号:1に示されるアミノ酸配列と少なくとも50%の配列同一性を有するアミノ酸配列

からなる群より選択されたアミノ酸配列

を含有するため、効率よくアポトーシスを抑制することができるという優れた性

質を発現する。本発明のBH4融合ポリペプチドは、BH4ドメインを含有するので、ミトコンドリア $\Delta\Psi$ ロスおよびシトクロムc漏出のそれぞれを抑制することができるため、アポトーシスを抑制することができると思われる。

さらに、本発明のBH4融合ポリペプチドは、細胞への取り込み作用を発揮するポリペプチドのアミノ酸配列またはその誘導体配列を含有するため、より細胞へ取り込まれ、効率よくアポトーシスを抑制することができるという優れた効果を発揮する。

本明細書において、「アポトーシス」とは、細胞の核の凝縮および断片化、該細胞自体の凝縮および断片化、該細胞の染色体DNAのヌクレオソーム単位（約180bp）の断片化などに代表される変化を特徴とする細胞の死に方であり、疾患などの病理的要因および生理的要因（例えば、免疫、ホルモン作用、発生などの生理的現象の発現など）により生じる現象を含む。

アンチアポトーシス性Bcl-2ファミリータンパク質とは、Bcl-2タンパク質と、該Bcl-2タンパク質に類似したタンパク質のうちアポトーシスを抑制する作用を有するタンパク質を意味する。なお、アポトーシスを抑制する活性を「アンチアポトーシス活性」といい、アポトーシスを促進する活性を「プロアポトーシス活性」という。

アポトーシスの抑制、および促進は、例えば、下記の方法により調べることができるが、かかる方法に限定されるものではない：VP16で24時間処理した後、1 μ M Hoechst 33342による染色後、全細胞に対する核断片化を呈した細胞の割合としてアポトーシスの程度を算出する。

また、アンチアポトーシス活性は、ミトコンドリアにおける $\Delta\Psi$ の低下と、シトクロムcの漏出の抑制とにより評価することができる。

$\Delta\Psi$ は、例えば、清水らの既報〔Oncogene, 13, 21-29 (1996)〕のようにローダミン123 (Rh123) の取り込みを測定することにより評価できる。

シトクロムc漏出は、ミトコンドリアを調製し、遠心分離し、ミトコンドリアペレットと上清とを得、ついで得られたペレットをR I P A緩衝液に再懸濁したミトコンドリア懸濁液と上清とを抗シトクロムc抗体を用いて、ウエスタンブロット解析に供することにより調べることができる。

前記アンチアポトーシス性B c 1-2ファミリータンパク質は、B c 1-2ホモロジー (B H) 1、B H 2、B H 3およびB H 4ドメインの配列ホモロジーを含有する。前記B H 1ドメインおよびB H 2ドメインと、おそらくB H 3ドメインは、変異構造解析により、プロアポトーシス性因子ファミリーのタンパク質との二量体化に非常に重要であり、それによりプロアポトーシス活性を阻害すると考えられる。

配列番号：1に示されるアミノ酸配列は、アンチアポトーシス性B c 1-2ファミリータンパク質にのみ共通して保存されているB H 4ドメインの配列である。かかるB H 4ドメインにおいて、 α -ヘリックスは、B H 4ドメインを含有したポリペプチドによるアポトーシス抑制作用に重要であり、特によく保存されているアミノ酸残基 (配列番号：1中のアミノ酸番号：8、9) が、該 α -ヘリックスの形成に重要な役割を果たしていると考えられる。また、配列番号：1中のアミノ酸番号：5、6、9、10および14のアミノ酸残基は、前記B H 4ドメインの α -ヘリックスの他のタンパク質との結合面に整列していることが推定される。

したがって、前記アンチアポトーシス性B c 1-2ファミリータンパク質のB H 4ドメインは、前記配列番号：1中のアミノ酸番号：5、6、8、9、10および14のアミノ酸残基が保存している配列であれば、配列番号：1に示されるアミノ酸配列において、少なくとも1残基のアミノ酸の置換、欠失もしくは挿入の変異を有するアミノ酸配列を有していてもよい。かかる変異を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドは、アンチアポトーシス活性を呈しうるポリペプチドであり、前記アンチアポトーシス活性は、前述の方法のように、ミトコンドリア

における $\Delta\Psi$ の低下と、シトクロムcの漏出の抑制とを評価することにより調べることができる。

ここで、「少なくとも1残基のアミノ酸の置換、欠失もしくは挿入を有するアミノ酸配列」は、公知の方法によりペプチドを合成する際、所望の配列に応じて任意に作製することができる。

さらに、前記アンチアポトーシス性Bc1-2ファミリータンパク質のBH4ドメインは、前記配列番号：1中のアミノ酸番号：5、6、8、9、10および14のアミノ酸残基が保存している配列であれば、配列番号：1に示されるアミノ酸配列と少なくとも50%、好ましくは70%以上、より好ましくは90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有していてもよい。

かかる配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドは、アンチアポトーシス活性を呈しうるポリペプチドであり、前記アンチアポトーシス活性は、前述の方法のように、ミトコンドリアにおける $\Delta\Psi$ の低下と、シトクロムcの漏出の抑制とを評価することにより調べることができる。

なお、本明細書において、「配列同一性」とは、2つのアミノ酸配列間、すなわち配列番号：1のアミノ酸配列と比較対象となるアミノ酸配列との間のアミノ酸残基の同一性をいう。前記「配列同一性」は、比較対象のアミノ酸配列の領域にわたって、最適な状態にアラインメントされた2つのアミノ酸配列を比較することにより決定されうる。ここで、比較対象のアミノ酸配列は、本明細書における配列番号：1に示されるアミノ酸配列と比べて、付加または欠失（例えば、ギャップ、オーバーハングなど）を有していてもよい。

配列同一性の数値（パーセンテージ）は、両方の配列に存在する同一のアミノ酸残基を決定して、適合部位の数を決定し、ついで、比較対象の配列領域内のアミノ酸残基の総数で、前記適合部位の数を割、得られた数値に100をかけることにより、算出されうる。最適なアラインメントおよびホモロジーを得るためのアルゴリズムとしては、例えば、BLASTなどが挙げられる。具体的には、遺

伝子解析ソフトGENETYX-SV/RG Ver. 4.01 (ソフトウェア開発社製)、遺伝子解析プログラムBLAST (インターネットアドレス <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>; 参考文献: Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol., 215, 403-410, (1990)、Altschul, S. F. et al., Nucleic Acid Res., 25, 3389-3402, (1997)) などを用いて、最適なアラインメントおよびホモロジーを得ることができる。

また、本発明においては、前記アンチアポトーシス性Bcl-2ファミリータンパク質のBH4ドメインは、かかるドメインを有するポリペプチドが、前述の方法によりアンチアポトーシス活性、すなわち、ミトコンドリアにおける $\Delta\Psi$ の低下と、シトクロムcの漏出の抑制とを呈するものであれば、配列番号: 1 に示されるアミノ酸配列と少なくとも50%、好ましくは70%以上、より好ましくは90%以上の配列ホモロジーを有するアミノ酸配列を有していてもよい。ここで、前記アンチアポトーシス性Bcl-2ファミリータンパク質のBH4ドメインは、保存的置換を有するアミノ酸配列を有していてもよい。前記「保存的置換」は、類似した性質 (すなわち疎水性、電荷、pK、立体構造上における特徴) を有するアミノ酸との置換; 本来のポリペプチドの生理活性を維持する程度にのみしか該ポリペプチドの立体構造、折り畳み構造を変化させ得ないアミノ酸との置換を包含する。保存的置換としては、例えば、下記: ①グリシン、アラニン; ②バリン、イソロイシン、ロイシン; ③アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン; ④セリン、スレオニン; ⑤リジン、アルギニン; ⑥フェニルアラニン、チロシンのグループ内での置換が挙げられる。

BH4ドメインの具体例としては、(a) Bcl-2のBH4ドメイン (配列番号: 2)、(b) Bcl-x_LのBH4ドメイン (配列番号: 3)、(c) Bcl-wのBH4ドメイン (配列番号: 4)、(d) C. elegans (エレガンス) Ced-9のBH4ドメイン (配列番号: 9のアミノ酸番号: 79～

98)などが挙げられる。本発明においては、Bc1-2のBH4ドメイン（配列番号：2）およびBc1-x_LのBH4ドメイン（配列番号：3）が好ましい。また、かかるBH4ドメインは、前記方法により、前述の方法のように、ミトコンドリアにおける $\Delta\Psi$ の低下と、シトクロムcの漏出の抑制が検出できるものであれば、前記(a)～(d)いずれかに記載のアミノ酸配列において、少なくとも1残基のアミノ酸の置換、欠失もしくは挿入を有するアミノ酸配列、および前記(a)～(d)いずれかに記載のアミノ酸配列と少なくとも50%、好ましくは70%以上、より好ましくは90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であってもよい。

本発明のBH4融合ポリペプチドに用いられる細胞への取り込み作用を発揮するポリペプチドとしては、例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)のTAT、HTLV-I由来のp27、HIV由来のart/trs、HSV-1由来のVP22、Drosophila由来のAntpなどが挙げられる。

細胞への取り込み作用を発揮するポリペプチドのアミノ酸配列としては、例えば、(i)配列番号：5に示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号：49～57を少なくとも含有する配列；

(ii)配列番号：24に示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号：1～13を少なくとも含有する配列；

(iii)配列番号：25に示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号：1～16を少なくとも含有する配列；

(iv)配列番号：26に示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号：1～301を少なくとも含有する配列；および

(v)配列番号：27に示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号：1～16を少なくとも含有する配列

などが挙げられる。なかでも、ヒト免疫不全ウイルスのTAT配列（配列番号：5）の少なくともアミノ酸番号：49～57の領域のアミノ酸配列（配列番号：

6) が好ましい。

前記「細胞への取り込み作用を発揮しうるポリペプチドのアミノ酸配列の誘導体配列」としては、(I) 細胞への取り込み作用を発揮しうるポリペプチドのアミノ酸配列において、少なくとも1残基の化学修飾基を有するアミノ酸配列、または

(II) 細胞への取り込み作用を発揮しうるポリペプチドのアミノ酸配列において、少なくとも1残基のアミノ酸の置換もしくは挿入を有するアミノ酸配列であって、得られたポリペプチドが細胞への取り込み作用を発揮しうるものが挙げられる。

細胞への取り込み作用は、ペプチドに対する抗体による免疫染色、またはペプチドに蛍光ラベルを導入することにより、顕微鏡下に調べることができる。

化学修飾基としては、蛍光性を呈する官能基、ポリペプチドの立体構造の形成には関与しない官能基などが挙げられ、該化学修飾アミノ酸残基を有するアミノ酸配列を含有したポリペプチドが、細胞への取り込み作用を発揮するものであればよい。なお、本明細書においては、化学修飾基とは、天然由来の「細胞への取り込み作用を発揮しうるポリペプチド」を構成するアミノ酸残基以外のアミノ酸残基（例えば、 β -アラニンなど）であってもよい。

蛍光性を呈する官能基としては、エオシンやフルオレセインイソチオシアネート (FITC) などが挙げられる。

ポリペプチドの立体構造の形成には関与しない官能基としては、 β -アラニン残基などに代表されるスペーサー基などが挙げられる。かかる官能基は、「細胞への取り込み作用を発揮しうるポリペプチド」と「アンチアポトーシス性 Bc1-2 ファミリータンパク質の BH4 ドメイン」とを融合させる末端に存在することが好ましい。かかる官能基を導入することにより、「細胞への取り込み作用を発揮しうるポリペプチド」および「アンチアポトーシス性 Bc1-2 ファミリータンパク質の BH4 ドメイン」のそれぞれが本来の立体構造を維持することがで

きるため、それぞれの機能を十分に発揮させることができる。

本発明のBH4融合ポリペプチドとしては、ヒト免疫不全ウイルスのTAT配列（配列番号：5）の少なくともアミノ酸番号：49～57の領域のアミノ酸配列（配列番号：6）と、（a）Bcl-2タンパク質のBH4ドメイン（配列番号：2）配列、（b）Bcl-x_Lタンパク質のBH4ドメイン（配列番号：3）のアミノ酸配列、（c）Bcl-wのBH4ドメイン（配列番号：4）のアミノ酸配列または（d）C. elegans（エレガンス）Ced-9のBH4ドメイン（配列番号：9のアミノ酸番号：79～98）とを含有するポリペプチドが好ましい。

本発明のBH4融合ポリペプチドは、具体的には、配列番号：7、8、28、29、30、31、32および33からなる群より選ばれた1種のアミノ酸配列を有するポリペプチドが好ましい。

本発明のBH4融合ペプチドであるCys（TAT）-β-Ala-BH4ペプチドは、Fmocのリンクアミドレジンを用いて、Fmoc法によりABI433A自動合成機で合成することができる。得られた保護ペプチド樹脂をトリフルオロ酢酸を含有した試薬で処理し、遊離ペプチドを逆相HPLCで精製する。つぎに、DMFに溶解したエオシン-5-ヨードアセトアミドと、50mMのリン酸緩衝液（pH7.7）に溶解させた上記の精製されたペプチドを混合し、室温で1時間反応させる。反応後、再度、逆相HPLCで精製し、シングルピークとして分取する。精製試料はMALDI-TOF MSで分子量を確認する。

本発明のBH4融合ポリペプチドによれば、例えば、HeLa細胞におけるアポトーシス抑制能として、該BH4融合ポリペプチド非存在下に比べ、少なくとも50%、好ましくは70%以上、より好ましくは、90%以上の抑制率が期待できる。

本発明のBH4融合ポリペプチドは、アンチアポトーシス活性を発現するため、アポトーシス抑制剤の有効成分として使用することができる。かかるアポト-

シス抑制剤も本発明に含まれる。

本発明のアポトーシス抑制剤は、前記BH4融合ポリペプチドを含有することを1つの特徴とする。

本発明のアポトーシス抑制剤は、アンチアポトーシス活性を発現するBH4融合ポリペプチドを含有するため、AIDS、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、色素性網膜炎、小脳変性など）、骨髓異形成疾患（再生不良性貧血など）、虚血性疾患（心筋梗塞、脳梗塞、脳卒中、虚血性再灌流障害など）、劇症肝炎、アルコールなどの中毒による肝疾患、感染性多臓器不全、糖尿病などの治療効果が期待される。本発明には、前記アポトーシス抑制剤を前記疾患患者に投与し、アポトーシスを抑制し、それにより疾患を治療することを特徴とする、前記疾患の治療方法も包含される。かかる治療方法は、なかでも、虚血性疾患、特に、心筋梗塞、脳梗塞、とりわけ、心筋梗塞の治療に好適である。また、臓器移植の際に用いられる臓器の保存液に添加することにより、移植時までの臓器をより適した状態で保存できることが期待される。

本発明のアポトーシス抑制剤は、前記BH4融合ポリペプチドを特定の細胞への取込みが容易になるように各種修飾を施した形態で含有してもよい。また、本発明のアポトーシス抑制剤は、アンチアポトーシス活性を発揮する範囲で、通常用いられる各種助剤を含有してもよい。

かかるアポトーシス抑制剤を投与する際、その投与形態、投与方法、投与量は、対象となる個体の年齢、体重、疾患の状態などにより適宜設定されうる。

さらに、本発明により、前記疾患、なかでも、虚血性疾患、特に、心筋梗塞、脳梗塞、とりわけ、心筋梗塞の予防または治療剤の製造のためのBH4融合ポリペプチドの使用が提供される。

以下、実施例などにより本発明を具体的に説明するが、本発明は、かかる実施

例に限定されるものではない。

試薬

ヒトシトクロムcとラットシトクロムcと交差反応する抗ヒトシトクロムcモノクローナル抗体(7H8, 2C12)として、E. マーゴリアッシュ(Margoliaash)博士(イリノイ大学、イリノイ州)の厚意により提供されたものを用いた。ラットVDACに交差反応する抗ヒトVDAC(ポーリン)モノクローナル抗体(31HL)として、カルバイオケム(Calbiochem)社より入手したものを用いた。抗ヒトBcl-x_Lポリクローナル抗体〔ヒトBcl-x_Lのアミノ酸配列(配列番号:10)のアミノ酸番号:193~212の領域に特異的なL19および該アミノ酸配列のアミノ酸番号:2~19の領域に特異的なS18〕は、サンタクルーズバイオテクノロジー(Santa Cruz Biotechnology)社から入手したものを用いた。ハイドロキシアパタイトおよびセライトとして、それぞれバイオラッド(Bio-Rad)社およびロス(Roth)社から入手したものを用いた。ジイソプロピルカルボジイミド/1-ヒドロキシベンゾトリアゾール活性化Fmoc保護アミノ酸は、ジェンザイム-シエナ(Genzyme-Syena)社から入手したものを用いた。他の試薬などは、特に記載しない限り、和光純薬社製の試薬などを用いた。

参考例1 DNAトランスフェクションおよびアポトーシスアッセイ

ヒトB細胞由来cDNAライブラリー(クローンテック社製)を鋳型とし、配列番号:11および配列番号:12のそれぞれで示される配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、ブルーフリーディングPfu DNAポリメラーゼ(ストラタジーン社製)を用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により、ヒトbcl-x_L変異体DNAを作製した。前記ヒトbcl-x_L変異体DNAの配列を配列表の配列番号:13に示す。得られた増幅断片をpUC-GAG

GS発現ベクター〔清水ら, *Oncogene*, 13, 21-29 (1996)〕にそれぞれサブクローニングした。

リポフェクタミンを用い、DNAトランスフェクションをモニターするためのグリーンフルオレッセンスプロテイン（以下、GFPという）の発現構築物pEGFP-N1'（クローンテック社製）（0.1 μ g）と共にヒトBcl-x_L またはその変異体の発現プラスミド（0.1 μ g）により、ヒト頸部癌細胞株であるHeLa細胞を24時間トランスフェクトした。

得られたトランスフェクト細胞をVP16で24時間処理した。ついで、1 μ M Hoechst 33342による染色と、全陽性細胞に対する核断片化を呈したGFP陽性細胞の割合として、アポトーシスの程度を算出した。

また、崩壊促進因子（DAF）を発現させる場合、0.1 μ gのDAF発現構築物（pUC-CAGGS-DAF）と共にヒトBcl-x_L またはその変異誘導体の発現プラスミド（各0.1 μ g）により、HeLa細胞を24時間トランスフェクトした。24時間後、得られた細胞を抗ヒトDAF抗体とFITC結合抗マウスIgGとで1時間染色した。ついで、セルソーター〔商品名：FACS-Vantage, ベクトン・ディッキンソン（Becton-Dickinson）社製〕を用いてDAF陽性細胞を採取し、DAFおよびBcl-x_L の発現をフローサイトメーターにより評価した。前記のようにして集められたDAF陽性細胞を200 μ MのVP16で24時間処理した。その後、細胞を10 μ M ジギトニンで37℃で10分間処理し、遠心分離により上清とペレットとを分離した。シトクロムc量を抗ハトシトクロムc抗体を用いたウエスタンブロット解析により推定した。

参考例2 ミトコンドリアの生化学的パラメータ（ $\Delta\Psi$ およびシトクロムc漏出）の測定

清水らの既報〔*Oncogene*, 13, 21-29 (1996)〕に従って

単離したラット肝臓ミトコンドリア (1mgタンパク質/ml) を 0.3M マンニトール、10 mM HEPES/K⁺ (pH 7.4)、0.1% 脂肪酸フリーの BSA、1mM リン酸カリウム、40 μ M CaCl₂ および活性化のための 4.2mM コハク酸塩を含む培地で組換えタンパク質の存在下または非存在下に 25°C でインキュベートした。

$\Delta\Psi$ について、清水らの既報 [Oncogene, 13, 21-29 (1996)] のようにローダミン 123 (Rh123) の取り込みを測定することにより評価した。

シトクロム c 漏出について、前記ミトコンドリアを遠心分離し、得られたペレットを RIPA 緩衝液に再懸濁してミトコンドリア懸濁液を得、該ミトコンドリア懸濁液と上清とを抗シトクロム c 抗体を用いて、ウエスタンブロット解析に供することにより調べた。

参考例 3 免疫沈降およびウエスタンブロット解析

精製 VDAC (20 μ g/ml) を組換え Bcl-x_L (rBcl-x_L) と組換え $\Delta 21$ (r $\Delta 21$) とインキュベートし、得られた混合物を抗 Bcl-x_L (L19) 抗体と正常ラビット IgG とにより免疫沈降させた。ポリペプチドと VDAC との間の相互作用を検出するために、単離ミトコンドリア (1mg) を 20 μ g の Bcl-x_L N 末端ポリペプチドまたは Bcl-x_L C 末端ポリペプチドと 5 分間インキュベートした。ついで、得られたミトコンドリアをペレット化し、洗浄し、プロテイナーゼインヒビター (0.1mM p-APMSF, 10 μ g/ml アプロチニン, 1 μ g/ml キモスタチン, 1 μ g/ml ロイペプチン, 1 μ g/ml アンチパイン, 1 μ g/ml ペプスタチン) の存在下、溶解用緩衝液 (10mM HEPES, pH 7.4, 142.5mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM EGTA および 0.5% NP40) に懸濁した後、超音波破碎を行なった。免疫沈降は、用いたポリペプチドに対応する抗 Bcl

-xポリクローナル抗体で行なった。抗VDAC抗体を用いたウェスタンブロッティングによりVDACの共免疫沈降を検出した。

参考例4 リボソームでのVDACの再構成

精製VDACを、清水らの既報〔Nature, 399, 483-487 (1999)〕に記載の超音波凍結融解手法により、小さな単膜リボソームに再構成した。スクロース取り込み実験は、リボソームの膨潤を評価することにより行なった。

pH 5.2で生産されたリボソームを、rBcl-x_L、rΔ21、rBaxまたはポリペプチドと共に1mlのリボソームバッファー中25℃で3分間インキュベートした。なお、酸性pHは、rBcl-x_LとrBaxのリボソームへの効率のよい取り込みに要求される条件である。ついで、スクロースを50mMまで添加し、リボソームの膨潤を分光光度計(F-4500、日立製作所社製)を用いて、520nmの波長で光分散の減少により評価した。スクロース取り込みは、清水らの既報〔Nature, 399, 483-487 (1999)〕に記載の¹⁴C-スクロース取り込みからも推定された。

実施例1 ヒトBcl-x_L およびヒトBcl-x_L Δ21の精製

ヒトBcl-x_L およびBcl-x_L Δ21 (Bcl-x_L のN末端21アミノ酸残基を欠失)を大腸菌株DH5α中グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質として発現させ、得られた融合タンパク質をグルタチオンセファロースカラムに供して精製した。ついで、トロンビンによる切断により、ヒトBcl-x_L またはBcl-x_L Δ21とGSTとを分離した。また、ヒトBaxは、成田らの文献〔Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 95, 14681-14686 (1998)〕に従って得られた。得られた精製タンパク質を緩衝液〔組成: 20mM Tris-HCl (pH 7.4

)、2mM $MgCl_2$ 、1mM ジチオスレイトール]に溶解した。挿入断片を持たないベクター由来のGSTタンパク質を調製し、模擬の対照タンパク質として用いた。ラット肝臓VDACを清水らの既報[Nature, 399, 483-487 (1999)]に従って精製した。得られたVDACは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一のバンドを示した。

実施例2 ポリペプチドの合成

ジイソプロピルカルボジイミド/1-ヒドロキシベンゾトリアゾール活性化Fmoc保護アミノ酸を用いて、モデル396マルチプルポリペプチドシンセサイザー(アドバンスド・ケムテック(Advanced Chemtech)社製)でポリペプチドを合成した。

合成したポリペプチドを以下に示す:

合成ポリペプチド:

ヒトBcl-x_L BH4 (ヒトBcl-x_Lのアミノ酸番号: 4-23): SNRELVVDFLSYKLSQKGYS (配列番号: 3)、

第14図に記載された該ヒトBcl-x_L BH4 (ヒトBcl-x_L BH4のアミノ酸番号: 4-23)の変異体(配列番号: 14~21)、

ヒトBcl-2 BH4 (ヒトBcl-2 BH4のアミノ酸番号: 7-30): TGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEW (配列番号: 2)、

ヒトBak BH4 (ヒトBak BH4のアミノ酸番号: 27-50): VAQDTEEVFRSYVFYRHQQEQEAE (配列番号: 22)。

前記ポリペプチドについて、それぞれ、マトリックス介助レーザーデソープシオンイオン化-飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF MS)により、純度が95%を超えることが確認された。

Bcl-x_LのN末端(アミノ酸番号: 2-19)ポリペプチドおよびBcl-x_LのC末端(アミノ酸番号: 193-212)ポリペプチドは、サンタクル

ーズバイオテクノロジー社から購入した。

HIV TAT（配列番号：5）のタンパク質トランスダクションドメイン〔PTD（アミノ酸番号：49-57）〕に対応する、ポリペプチドTAT-PTDのN末端にエオシン結合システイン残基を導入したポリペプチド〔エオシン-C-RKKRRQRRR（配列番号：23）〕を合成した。ついで、 β -アラニン残基を介してエオシン標識TAT-PTDポリペプチドとヒトBcl-x_L BH4ポリペプチドとを結合させることにより、TAT-PTD-BH4ポリペプチド（TAT-BH4ポリペプチド）を作製した。

得られたTAT-BH4ポリペプチドは、逆相HPLCを用い、タンパク質由来の蛍光（280nmにおける吸収）をモニターすることにより、純度が、90%以上であることが確認された。

実施例3 アポトーシスミトコンドリア変化のBcl-x_Lによる抑制におけるBH4ドメインの重要性

Bcl-2/Bcl-x_Lがアポトーシスミトコンドリア変化をブロックすることによりアポトーシスが抑制されるので、BH4ドメインがBcl-2/Bcl-x_Lによるアポトーシスミトコンドリア変化の抑制に必要とされるかどうかを調べた。

参考例1に従い、Bcl-x_LまたはそのBH4欠失変異体（ $\Delta 21$: Bcl-x_Lのアミノ酸残基2-21位を欠く）のDNAでHeLa細胞をトランスフェクトし、アポトーシスアッセイを行なった。DAFの発現構築物と共にBcl-x_L、 $\Delta 21$ またはベクター単独の発現構築物でHeLa細胞を一過的にトランスフェクトした。DAFの細胞表面発現を用いて、前記DNAでトランスフェクトした細胞を同定し、これらの細胞をフローサイトメーターを用いて回収した。

その結果、第1図に示すように、BH4ドメインを有するBcl-x_Lを発現

するトランスフェクト細胞は、 $100\mu\text{M}$ または $200\mu\text{M}$ のVP16でのアポトーシス誘導に抵抗性を示すが、BH4ドメインを欠く $\Delta 21$ を発現するトランスフェクト細胞およびベクター単独のトランスフェクト細胞は、 $100\mu\text{M}$ のVP16でのアポトーシス誘導に抵抗性を示さない。

また、第2図に示すように、93%を超える純度のDAF陽性細胞を得られた。また、得られた、ほぼ全てのDAF陽性細胞は、Bcl-x_Lまたは $\Delta 21$ を同等のレベルで発現した。

ついで、回収細胞をVP16で処理してアポトーシスを誘導した後、シトクロムc漏出を試験した。その結果、第3図に示されるように、Bcl-x_Lの過剰発現は、VP16処理後のミトコンドリアからのシトクロムc漏出を妨げたが、 $\Delta 21$ の過剰発現は、シトクロムc漏出を妨げなかったので、BH4ドメインがアポトーシスシトクロムc漏出を抑制するのに必要とされることが示される。また、この結果と一致して、第4図に示すように、単離ミトコンドリアを用いた場合、組換えBcl-x_L (rBcl-x_L) は、Ca²⁺誘導されたミトコンドリア $\Delta\Psi$ ロスとシトクロムc漏出との両方を抑制したが、組換え $\Delta 21$ (r $\Delta 21$) は、実際にミトコンドリア $\Delta\Psi$ ロスとおよびシトクロムc漏出それぞれの抑制活性を示さなかった。また、ミトコンドリアが、例えば、アトラクチロシド、過酸化水素などの他のアポトーシス刺激に曝された場合も、同様の結果が得られた。

実施例4 VDAC調節におけるBH4ドメインの役割

Bcl-x_L が直接VDACに結合し、このチャネルの活性を抑制して、アポトーシスシトクロムc漏出の抑制および $\Delta\Psi$ ロスの抑制を導くことが知られている。また、清水らの既報 [Nature, 399, 483-487 (1999)] に記載のようにBcl-x_L とVDACとの間の相互作用も細胞で検出されている。そこで、VDAC調節におけるBH4ドメインの機能的役割を調べた。

まず、参考例3に従って共免疫沈降解析を行ない、Bc1-x_LとVDACとの間の相互作用におけるBH4ドメインの欠損の影響を調べた。その結果、第5図に示すように、共免疫沈降解析により、Bc1-x_LおよびVDACは、同程度にVDACと相互作用するため、BH4ドメインは、Bc1-x_LとVDACとの間の結合に重要ではないことが示唆される。

次に、VDAC活性の調節におけるBH4ドメインの機能的役割を調べた。2つの手法：清水らの既報〔Nature, 399, 483-487 (1999)〕に記載の放射標識スクロースを用いる方法と、光散乱の減少をモニターすることにより、リボソームのスクロース依存性膨潤を測定する方法とを用いて、VDAC含有リボソームへのスクロース取り込みを評価して、VDAC活性を測定した。その結果を第6図に示す。顕微鏡観察またはフローサイトメトリー解析により、スクロース取り込み依存性リボソーム膨潤が確認されたので、該リボソーム膨潤は、水の浸透圧依存的な流出を圧倒する、大きなVDACポアを介したスクロースと水の速い流入にもとづくと思われる。VDACリボソームは、第6図に示すように、スクロースの存在下に膨潤したが、VDACを含有しないリボソームと変性VDACリボソームとは、膨潤を示さなかったため、スクロース取込みがVDACにより介されることが示される。

第7図に示すように、rBc1-x_LのVDACリボソームへの添加は、VDAC媒介スクロース取り込みを抑制し、rΔ21のVDACリボソームへの添加は、VDAC媒介スクロース取り込みに影響しなかったため、BH4がBc1-x_LによるVDACの抑制に必須であることが示される。また、第8図に示すように、放射標識スクロースの流入を評価することによりVDAC活性を直接測定した場合にも同様の結果が得られた。

これらの結果により、BH4ドメインは、VDACへの結合に顕著に影響を与えないが、該ドメインは、Bc1-x_LがVDAC活性を抑制することに要求されることが示唆される。

実施例5 Bc1-x_LのBH4ドメインのVDAC活性抑制への関与

VDAC活性の抑制におけるBH4ドメインの役割を明らかにするために、Bc1-x_Lのドメインに対応するポリペプチドをVDACリボソームに添加し、VDAC活性を評価した。その結果、第9図に示されるように、BH4ポリペプチドは、濃度依存的様式でVDAC活性を抑制した。

20 μ g/ml BH4ポリペプチドの存在下における光散乱の増加（第9図に示す）は、該BH4ポリペプチドによるVDACの完全な閉鎖後のVDACリボソームの浸透圧依存性収縮によるものであった。また、第10図に示すように、Bc1-2由来のBH4ポリペプチドは、VDAC活性を抑制したが、Bak由来の対応するポリペプチドは不活性であった。Bc1-2およびBc1-x_L由来のBH4ポリペプチドは、VDACを含有しないリボソームにおいて、いかなる有意な影響をも示さなかった。清水らの既報（Nature, 399, 483-487 (1999)）によれば、BaxおよびBakがVDACの活性を促進し、この影響がBc1-x_Lにより拮抗されることが示されている。第11図に示すように、BH4ポリペプチドは、投与量依存的様式で、VDAC活性のrBax誘導促進を抑制したが、Bc1-x_LのBH4ポリペプチドは、Baxに結合しなかった。

これらの結果により、rBc1-x_LおよびBaxのVDACに対する拮抗的な影響がヘテロダイマーの形成によるものでなく、独立した作用によるものであることが示唆される。また、一般的にrBc1-x_Lの膜への挿入を容易にする酸性pH（清水ら、Nature, 399, 483-487 (1999)）でVDACリボソーム実験を行なわれていたが、中性pHでポリペプチドを用いた場合にも、実際に同じ結果が得られた。

第12図に示すように、rBc1-x_Lと比較してより少ない程度であるが、Bc1-x_LのBH4ポリペプチドによるVDACの抑制に一致して、Bc1-

x_L のN末端断片（アミノ酸番号：2-9）とVDACとの間の相互作用が検出された。 $Bc1-x_L$ は、BH4以外の幾つかの領域でVDACに主に結合するので、他の領域は、恐らくVDACへの親和性および／または接近能を増加させることにより、BH4の活性を促進するのであろう。これらの結果により、アンチアポトーシス性 $Bc1-2$ ファミリータンパク質のBH4ドメインがVDACを抑制するに十分であることが示唆される。

$Bc1-x_L$ の L^8V^9 、 F^{12} などのBH4ドメインの保存残基のいくつかは、 $Bc1-2/Bc1-x_L$ のアンチアポトーシス活性に重要であることが報告されている。BH4ドメインによるVDACの抑制における前記保存残基の役割を評価するために、第13図に示す数種類のBH4変異体ポリペプチドを作製し、VDACにおける抑制効果を調べた。その結果を第14図に示す。

第14図に示されるように、 L^8V^9 の変異体ポリペプチド（LV89VF、LV89GGおよび ΔLV ）と $F^{12}L^{13}$ の変異体ポリペプチド（FL1213GGおよび ΔFL ）は、VDACを抑制しなかった。さらに、 D^{11} での1アミノ酸置換（D11G）および L^{17} での1アミノ酸置換（L17W）のそれぞれを有するポリペプチドは、正常BH4ポリペプチドのVDAC抑制活性の約70%および約半分であり、フアングらの既報〔Huang, D. C., et al., EMBO J., 117, 1029-1039 (1998)〕に記載のように、アンチアポトーシス活性の減少に一致した。これらの結果は、 $Bc1-x_L$ のアンチアポトーシス機能がVDAC活性の抑制により媒介されることを示唆する。

実施例6 $Bc1-x_L$ のBH4ドメインによる Ca^{2+} 誘導された単離ミトコンドリアの $\Delta\Psi$ の漏出の抑制

前記第13図に示す数種類のBH4変異体ポリペプチドを用い、 $\Delta\Psi$ の漏出における影響を調べた。単離ミトコンドリア（1mg/ml）を40 μ M Ca^{2+} の存在下に20 μ g/mlの $Bc1-x_L$ BH4ポリペプチドとインキュベ

トし、ローダミン123強度を連続的にモニターした結果を第14図の左パネルに示す。また、単離ミトコンドリア(1mg/ml)を40 μ M Ca^{2+} の存在下に20 μ g/mlのBcl-x_L BH4ポリペプチドおよび種々の変異体ポリペプチドを15分間インキュベートして、ローダミン123強度を用いて $\Delta\Psi$ を測定した結果を第14図の右パネルに示す。

第14図および15に示されるように、Bcl-x_LのBH4ポリペプチドは、 Ca^{2+} 誘導 $\Delta\Psi$ ロスおよびVDAC活性を有意に抑制するが、組換えBcl-x_Lのモル濃度の約25倍を超えるモル濃度でのみ有効で、BH4以外の他の領域がVDACへの接近能を増加させるであろうことに一致する。実際にアンチアポトーシス活性に影響する、Bcl-2/Bcl-x_LのBH1変異体およびBH2変異体は、Bcl-2/Bcl-x_LがVDACへの結合能に実際に影響する。さらに、全BH4変異体ポリペプチドは、それぞれ、ミトコンドリア $\Delta\Psi$ を抑制する能力(第14図)に比例してVDAC活性を抑制する能力(第15図)を示した。

これらの結果により、アンチアポトーシス性Bcl-x_LのBH4ドメインが、VDAC活性の抑制能に並行して、アポトーシスミトコンドリア変化の抑制能を有することが示唆される。

実施例7 BH4ドメインによるアポトーシス(細胞死)の抑制

前記実施例6の結果より、BH4ポリペプチド単独でもアポトーシス性のミトコンドリア変化を抑制する能力を有することが導き出されたので、さらに、BH4ポリペプチドがアポトーシスを抑制する能力を有する可能性を調べた。

そこで、細胞へのBH4ポリペプチドの移送を容易にするため、N末端エオシン標識システインとBcl-x_L BH4ポリペプチドと融合させたHIV TATタンパク質のPTDとを含む30アミノ酸残基の前記TAT-BH4ポリペプチドを合成し、TAT-BH4ポリペプチドの存在下に200 μ M VP16

でH e L a細胞を処理し、光位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡それぞれにより観察した。なお、T A T - P T Dは、迅速な、濃度依存的様式でのタンパク質の細胞への輸送を容易にすることが知られている。その結果を第16図に示す。上段パネルは、細胞形態、下段パネルは、ポリペプチドの細胞内蓄積を調べた結果を示す。

第16図は、培養培地に添加されたT A T - B H 4 ポリペプチドが約90%のトランスフェクション効率で細胞に入ったことを示す。マイトトラッカーによるトランスフェクト細胞の共染色により、T A T - B H 4 ポリペプチドが、主にミトコンドリアに局在することが示された。第16図、第17図、第18図に示されるように、T A T - B H 4 ポリペプチドは、濃度依存的様式でV P 1 6 誘導アポトーシスを有意に抑制したが、T A T のみのポリペプチドは、いかなる濃度においてもV P 1 6 誘導アポトーシスを有意に抑制しなかった。また、ポリペプチドの細胞への非効率的な運搬の結果、B H 4 のみのポリペプチドは、V P 1 6 誘導アポトーシスへの影響を示さなかった。これらの知見により、T A T - B H 4 ポリペプチドは、細胞におけるアポトーシス性の細胞死を抑制するに十分であることが示される。

実施例8 各種B H 4 融合ポリペプチドのアンチアポトーシス活性の評価

実施例2と同様にして、下記アミノ酸配列（配列番号：28～33）を有するT A T - B H 4 ポリペプチド（B H 4 融合ポリペプチド）を合成した。

ポリペプチド1（配列番号：28）

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg β -Ala Ser Asn Arg Glu Leu

Val Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser

ポリペプチド2（配列番号：29）

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg β -Ala Ser Asn Arg Asp Leu

Val Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser

ポリペプチド 3 (配列番号: 30)

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Ser Asn Arg Glu Leu
Val Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser

ポリペプチド 4 (配列番号: 31)

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Ser Asn Arg Asp Leu
Val Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser

ポリペプチド 5 (配列番号: 32)

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Ser Asn Arg Glu Leu
Val Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser

ポリペプチド 6 (配列番号: 33)

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Ser Asn Arg Asp Leu
Val Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser

得られた各種BH4融合ポリペプチドをH₂Oに溶解して、0.1 μ g/ml
または1 μ g/mlのBH4融合ポリペプチド溶液を得た(アポトーシス抑制剤
)とHeLa細胞とを3時間接触させることにより、HeLa細胞を前処理した
。ついで、200 μ M VP16でHeLa細胞を処理し、アポトーシスを誘導
した。各細胞を1 μ M Hoechst 33342により染色し、全細胞に対
する核断片化を呈した細胞の割合としてアポトーシスの程度(生存率)を算出し
た。その結果を表1に示す。

表 1

B H 4 融合ポリペプチド	生存率 (%)	
	0.1 μ g/ml	1 μ g/ml
1	62.3	74.7
2	52.1	55.6
3	71.9	77.6
4	65.6	69.7
5	69.8	70.4
6	61.7	67.8
ペプチド	46.5	
VP16無 ペプチド無	97.3	

表 1 の結果より、細胞への取込み作用を発揮しうるポリペプチド (T A T) とアンチアポトーシス性 B c 1 - 2 ファミリータンパク質の B H 4 ドメインとの間のスパーサー基は、 β -アラニンのみでなく、アラニンまたはプロリンに置換することができることがわかる。また、アンチアポトーシス性 B c 1 - 2 ファミリータンパク質の B H 4 ドメイン部分において 4 番目のグルタミン酸をアスパラギン酸に置換した場合でも実用可能なレベルのアンチアポトーシス活性を有することがわかる。

配列表フリーテキスト

配列番号：1 は、アンチアポトーシス性 B c 1 ファミリータンパク質に保存された B H 4 ドメインのコンセンサス配列を示す。

配列番号：7 の配列中、1 位の X a a は、エオシン結合システイン残基を示し、11 位の X a a は β -アラニン残基を示す。

配列番号：8 の配列中、1 位の X a a は、エオシン結合システイン残基を示し、11 位の X a a は β -アラニン残基を示す。

配列番号：11 の配列は、ヒト b c 1 - x_L の DNA に基づいてデザインされた、変異体 b c 1 - x_L の作製のためのプライマーの配列である。

配列番号：12の配列は、ヒトbcl-x_LのDNAに基づいてデザインされた、変異体bcl-x_Lの作製のためのプライマーの配列である。

配列番号：13の配列は、合成されたbcl-x_L変異体DNAの配列である。

配列番号：14の配列は、合成されたBcl-x_LBH4変異体ポリペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号：15の配列は、合成されたBcl-x_LBH4変異体ポリペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号：16の配列は、合成されたBcl-x_LBH4変異体ポリペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号：17の配列は、合成されたBcl-x_LBH4変異体ポリペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号：18の配列は、合成されたBcl-x_LBH4変異体ポリペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号：19の配列は、合成されたBcl-x_LBH4変異体ポリペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号：20の配列は、合成されたBcl-x_LBH4変異体ポリペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号：21の配列は、合成されたBcl-x_LBH4変異体ポリペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号：23の配列は、ポリペプチドTAT-PTDのN末端にエオシン結合システイン残基を導入したポリペプチドの配列である。前記配列中、1位のXaaは、エオシン結合システイン残基を示す。

配列番号：28の配列は、合成されたBH4融合ポリペプチドのアミノ酸配列である。前記配列中、Xaaは、β-アラニン残基を示す。

配列番号：29の配列は、合成されたBH4融合ポリペプチドのアミノ酸配列

である。前記配列中、X a aは、 β -アラニン残基を示す。

配列番号：30の配列は、合成されたBH4融合ポリペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号：31の配列は、合成されたBH4融合ポリペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号：32の配列は、合成されたBH4融合ポリペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号：33の配列は、合成されたBH4融合ポリペプチドのアミノ酸配列である。

産業上の利用可能性

本発明のBH4融合ポリペプチドは、ミトコンドリア $\Delta\Psi$ ロスおよびシトクロムc漏出のそれぞれを抑制することができ、より効率よく細胞へ取り込まれるため、効率よくアポトーシスを抑制することができるという優れた効果を奏する。また、本発明のアポトーシス抑制剤は、アポトーシスを抑制することができるため、AIDS、神経変性疾患、骨髄異形成疾患、虚血性疾患、感染性多臓器不全、劇症肝炎、糖尿病などの治療剤として有用である。

請求の範囲

1. 細胞への取り込み作用を発揮しうるポリペプチドのアミノ酸配列またはその誘導体配列と、

(A) 少なくともアンチアポトーシス性 Bcl-2 ファミリータンパク質の BH4 ドメインの配列 (配列番号: 1) を含有するアミノ酸配列、

(B) 配列番号: 1 に示されるアミノ酸配列において、少なくとも 1 残基のアミノ酸の置換、欠失もしくは挿入を有するアミノ酸配列、および

(C) 配列番号: 1 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 50% の配列同一性を有するアミノ酸配列

からなる群より選択されたアミノ酸配列とを含有してなり、かつアポトーシスを抑制しうる BH4 融合ポリペプチド。

2. アンチアポトーシス性 Bcl-2 ファミリータンパク質の BH4 ドメインの配列が、(a) Bcl-2 タンパク質の BH4 ドメイン (配列番号: 2) の配列を含有するアミノ酸配列、

(b) Bcl-x_L タンパク質の BH4 ドメイン (配列番号: 3) の配列を含有するアミノ酸配列、

(c) Bcl-w の BH4 ドメイン (配列番号: 4) のアミノ酸配列、

(d) C. elegans (エレガンス) Ced-9 の BH4 ドメイン (配列番号: 9 のアミノ酸番号: 79~98)、

(e) 前記 (a) ~ (d) いずれかに記載のアミノ酸配列において、少なくとも 1 残基のアミノ酸の置換、欠失もしくは挿入を有するアミノ酸配列を有し、かつアポトーシスを抑制しうるポリペプチドのアミノ酸配列、および

(f) 前記 (a) ~ (d) いずれかに記載のアミノ酸配列と少なくとも 50% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつアポトーシスを抑制しうるポリペ

ブチドのアミノ酸配列

からなる群より選ばれた1種である、請求項1記載のBH4融合ポリペプチド。

3. 誘導体配列が、(I)細胞への取り込み作用を発揮しうるポリペプチドのアミノ酸配列において、少なくとも1残基の化学修飾基を有するアミノ酸配列、または

(II)細胞への取り込み作用を発揮しうるポリペプチドのアミノ酸配列において、少なくとも1残基のアミノ酸の置換もしくは挿入を有するアミノ酸配列であり、かつ細胞への取り込み作用を発揮しうるポリペプチドのアミノ酸配列、である、請求項1または2記載のBH4融合ポリペプチド。

4. 細胞への取り込み作用を発揮しうるポリペプチドが、ヒト免疫不全ウイルスのTAT、HTLV-I由来のp27、HIV由来のart/trs、HSV-1由来のVP22およびDrosophila由来のAntpからなる群より選ばれた少なくとも1種である、請求項1～3いずれか記載のBH4融合ポリペプチド。

5. 細胞への取り込み作用を発揮しうるポリペプチドのアミノ酸配列が、

(i) 配列番号：5に示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号：49～57を少なくとも含有する配列；

(ii) 配列番号：24に示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号：1～13を少なくとも含有する配列；

(iii) 配列番号：25に示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号：1～16を少なくとも含有する配列；

(iv) 配列番号：26に示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号：1～301を少なくとも含有する配列；および

(v) 配列番号：27に示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号：1～16を少なくとも含有する配列
からなる群より選ばれた少なくとも1種である、請求項4記載のBH4融合ポリペプチド。

6. ヒト免疫不全ウイルスのTAT配列（配列番号：5）の少なくともアミノ酸番号：49～57領域のアミノ酸配列（配列番号：6）と、

(a) Bc1-2タンパク質のBH4ドメイン（配列番号：2）のアミノ酸配列

、

(b) Bc1-x_Lタンパク質のBH4ドメイン（配列番号：3）のアミノ酸配列

、

(c) Bc1-wのBH4ドメイン（配列番号：4）のアミノ酸配列、

(d) C. elegans（エレガンス）Ced-9のBH4ドメイン（配列番号：9のアミノ酸番号：79～98）、

(e) 前記(a)～(d)のいずれか記載のアミノ酸配列において、少なくとも1残基のアミノ酸の置換、欠失もしくは挿入を有するアミノ酸配列であり、かつ細胞への取り込み作用を発揮しうるポリペプチドのアミノ酸配列、および

(f) 前記(a)～(d)のいずれか記載のアミノ酸配列と少なくとも50%の配列同一性を有するアミノ酸配列であり、かつ細胞への取り込み作用を発揮しうるポリペプチドのアミノ酸配列

からなる群より選ばれた1種とを含有してなる、請求項5記載のBH4融合ポリペプチド。

7. 配列番号：7、8、28、29、30、31、32および33からなる群より選ばれた1種のアミノ酸配列を有する、請求項6記載のBH4融合ポリペプチド。

8. 細胞への取り込み作用を発揮しうるポリペプチドのアミノ酸配列のアミノ末端にシステイン残基を有し、カルボシキル末端側に β -アラニン残基を有する、請求項1～7いずれか記載のBH4融合ポリペプチド。

9. 請求項1～7いずれかに記載のBH4融合ポリペプチドをコードしてなるDNA。

10. 請求項1～8いずれか記載のBH4融合ポリペプチドを含有してなるアポトーシス抑制剤。

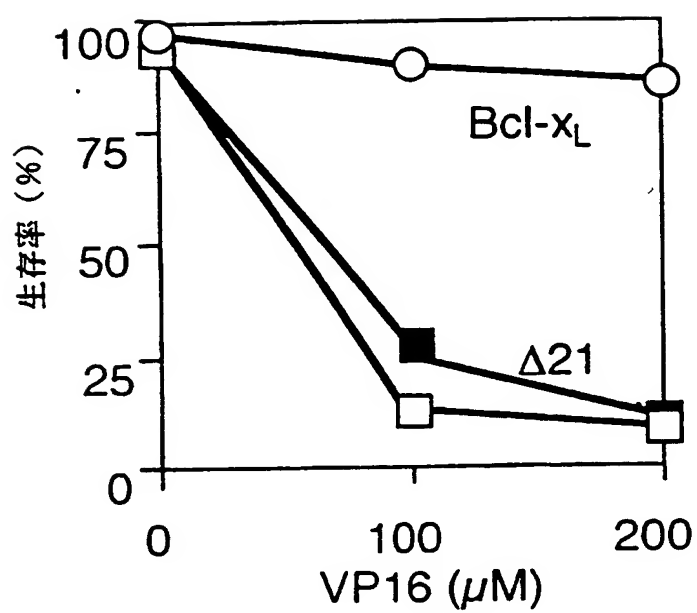
11. 請求項10記載のアポトーシス抑制剤を虚血性疾患患者に投与してアポトーシスを抑制し、それにより虚血性疾患を治療することを特徴とする、虚血性疾患の治療方法。

12. 虚血性疾患が、心筋梗塞である、請求項11記載の虚血性疾患の治療方法。

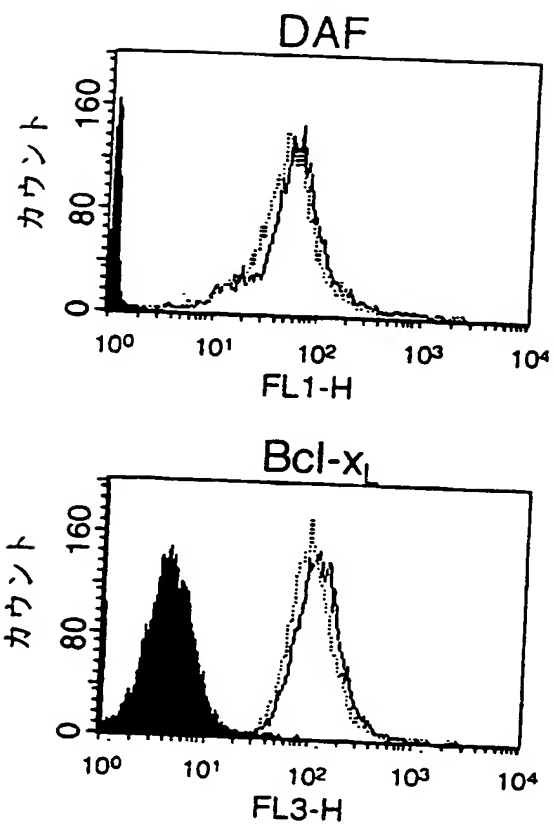
13. 虚血性疾患の予防または治療剤を製造するための、請求項1～7いずれかに記載のBH4融合ポリペプチドの使用。

14. 虚血性疾患が、心筋梗塞である、請求項13記載の使用。

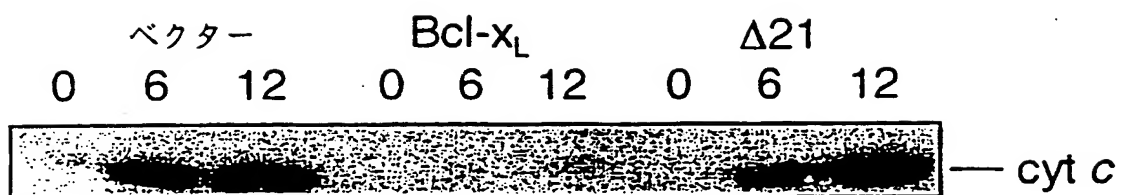
第 1 図



第 2 図

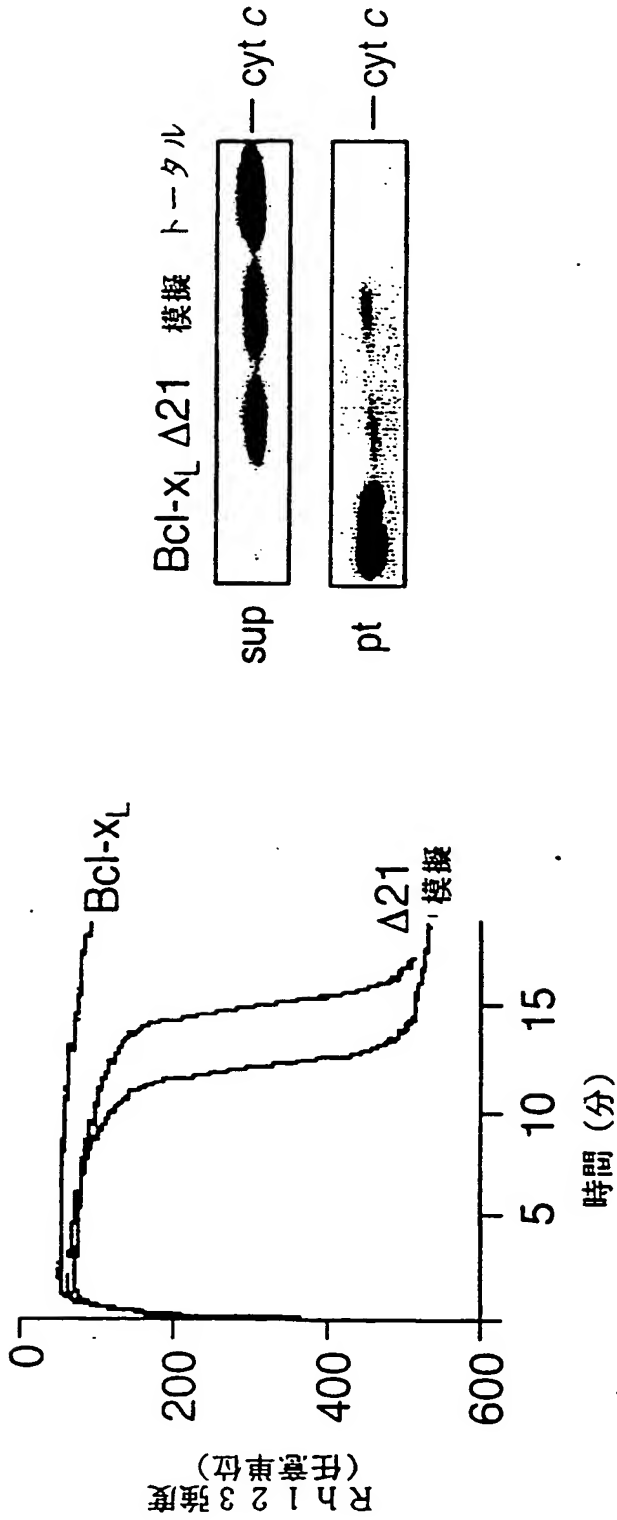


第 3 図

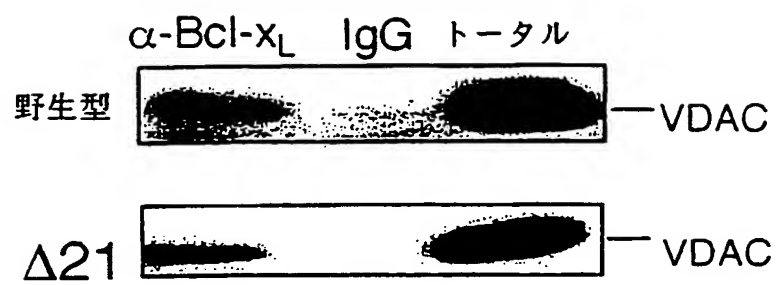


第 4 図

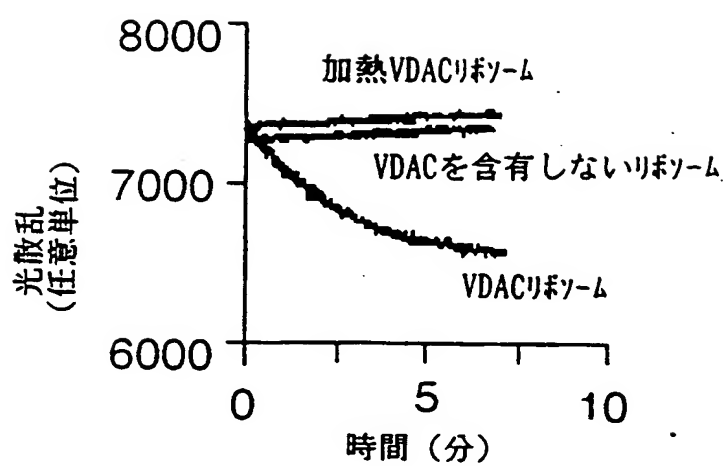
A B



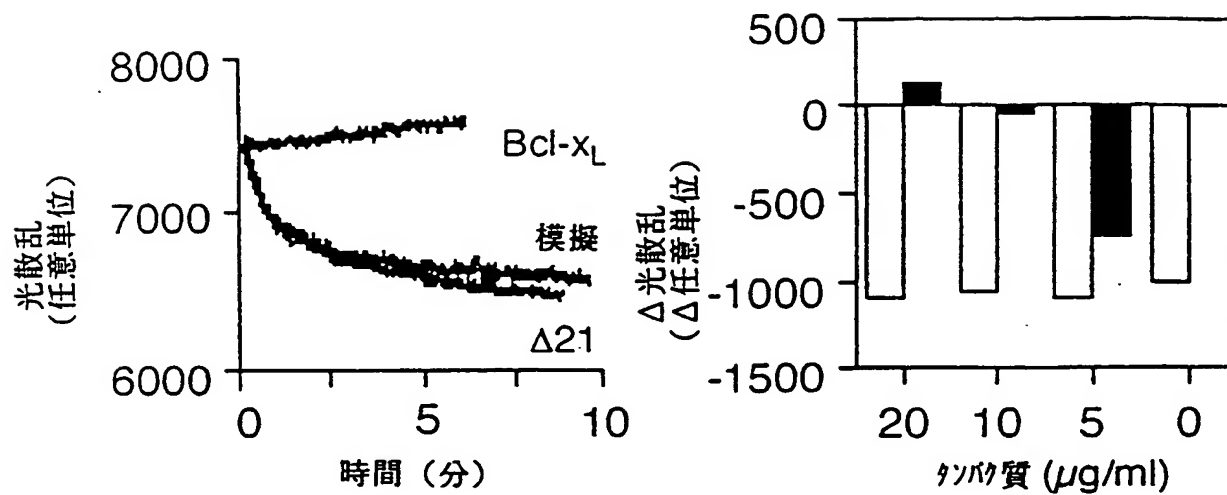
第 5 図



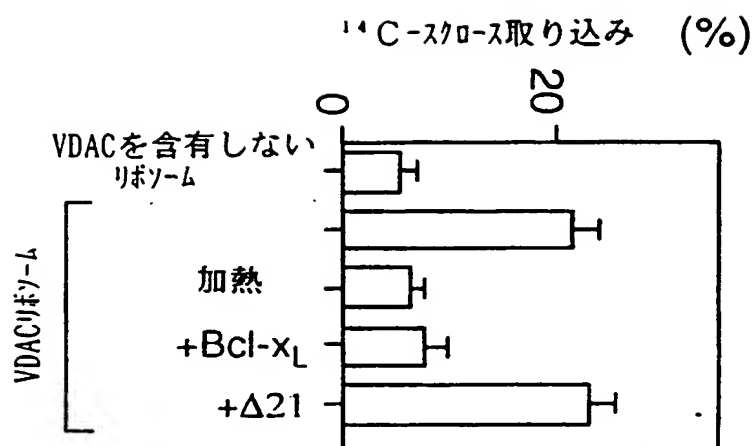
第 6 図



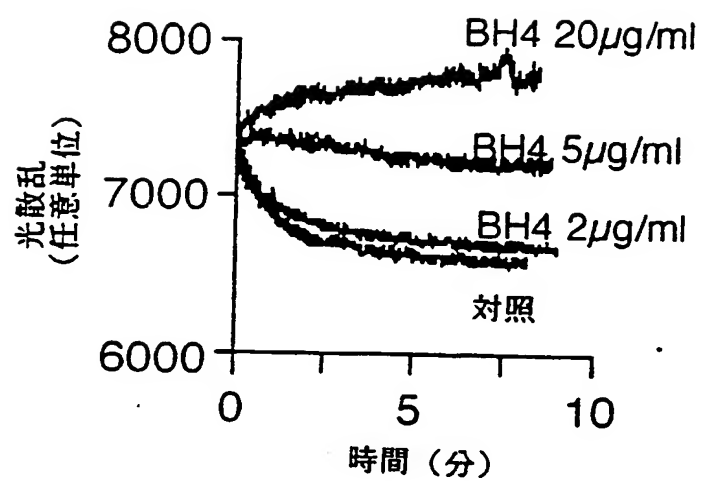
第 7 図



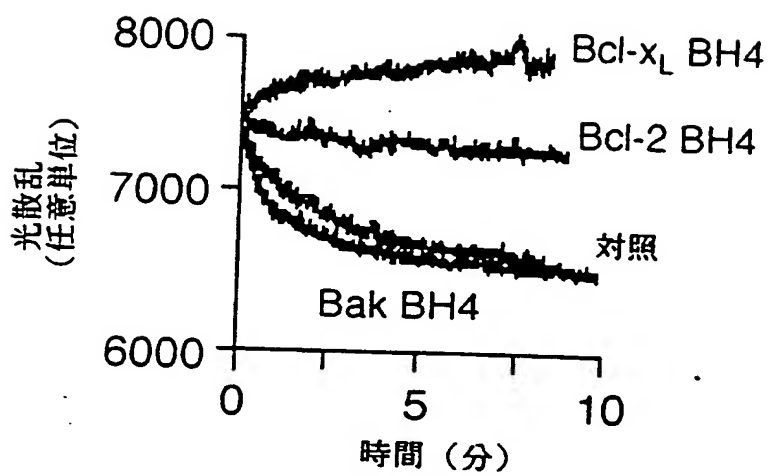
第 8 図



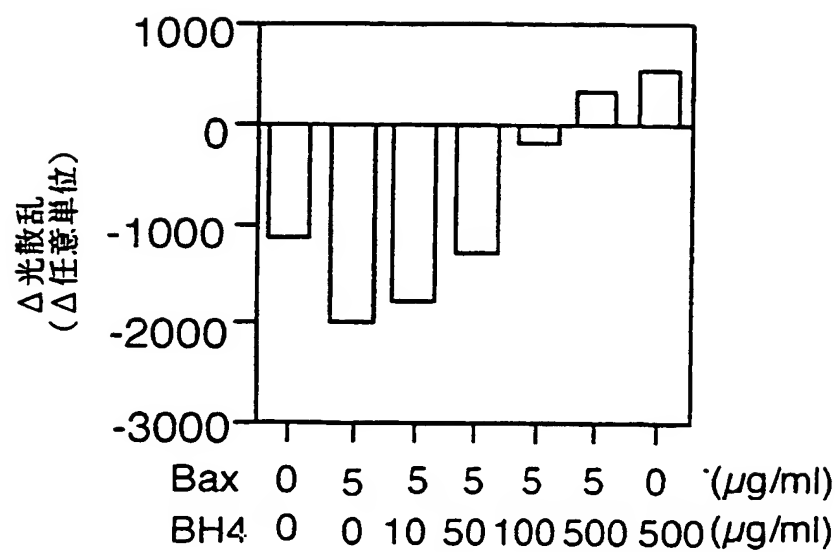
第 9 図



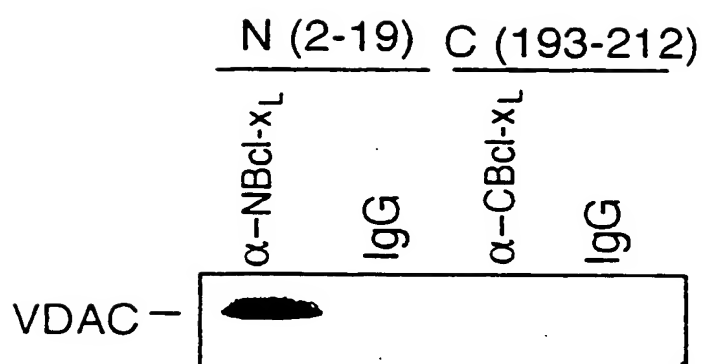
第 1 0 図



第 1 1 図



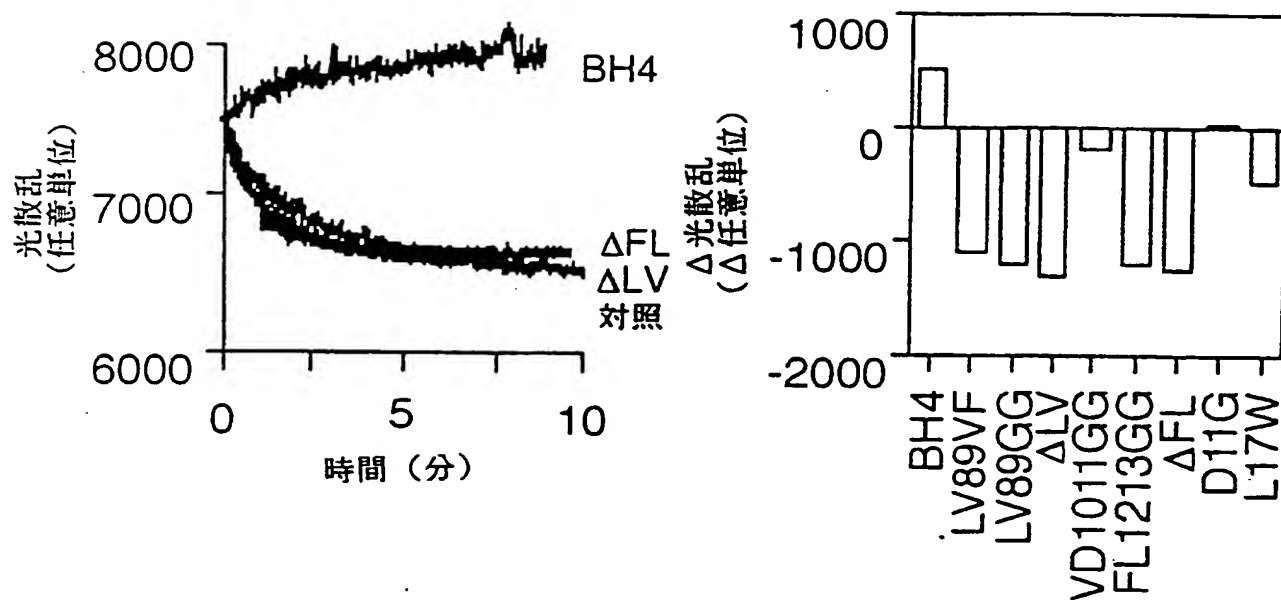
第 1 2 図



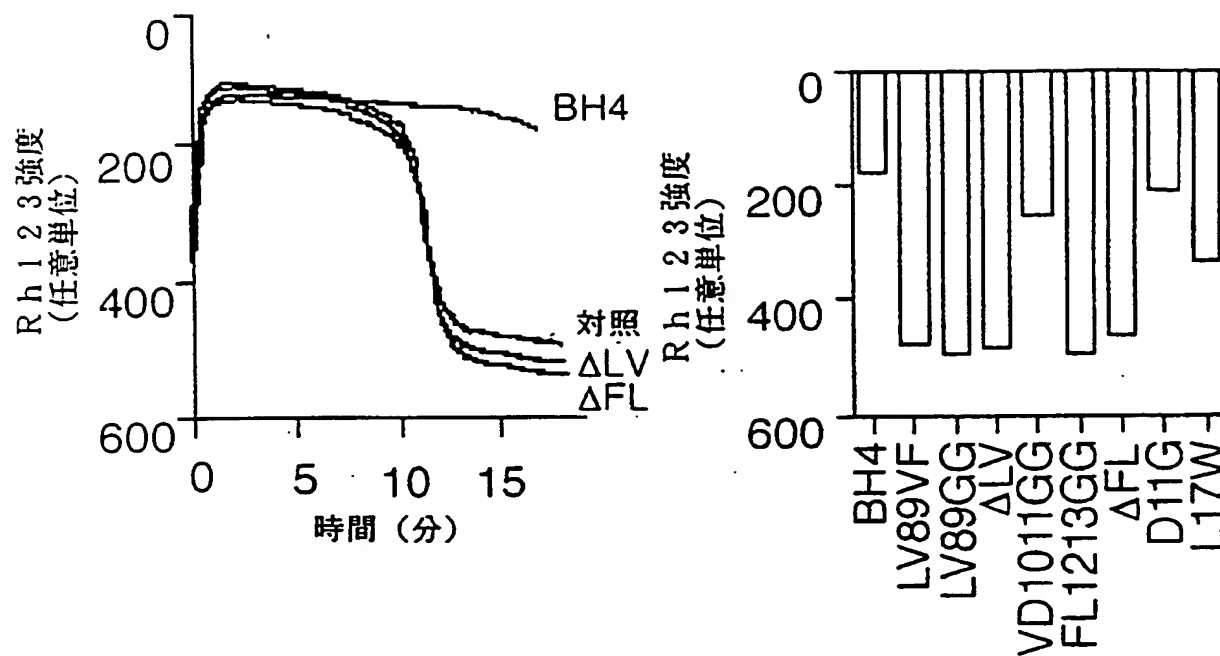
第 1 3 図

Bcl-x _L	4 SNRELVVDFLSYKLSQKGYS23
LV89VF	SNREVFVDFLSYKLSQKGYS
LV89GG	SNREGGVVDFLSYKLSQKGYS
ΔLV	SNRE--VDFLSYKLSQKGYS
VD1011GG	SNREVFGGFLSYKLSQKGYS
FL1213GG	SNRELVVDGGSYKLSQKGYS
ΔFL	SNRELVVD--SYKLSQKGYS
D11G	SNRELVVGFLSYKLSQKGYS
L17W	SNRELVVDFLSYKWSQKGYS

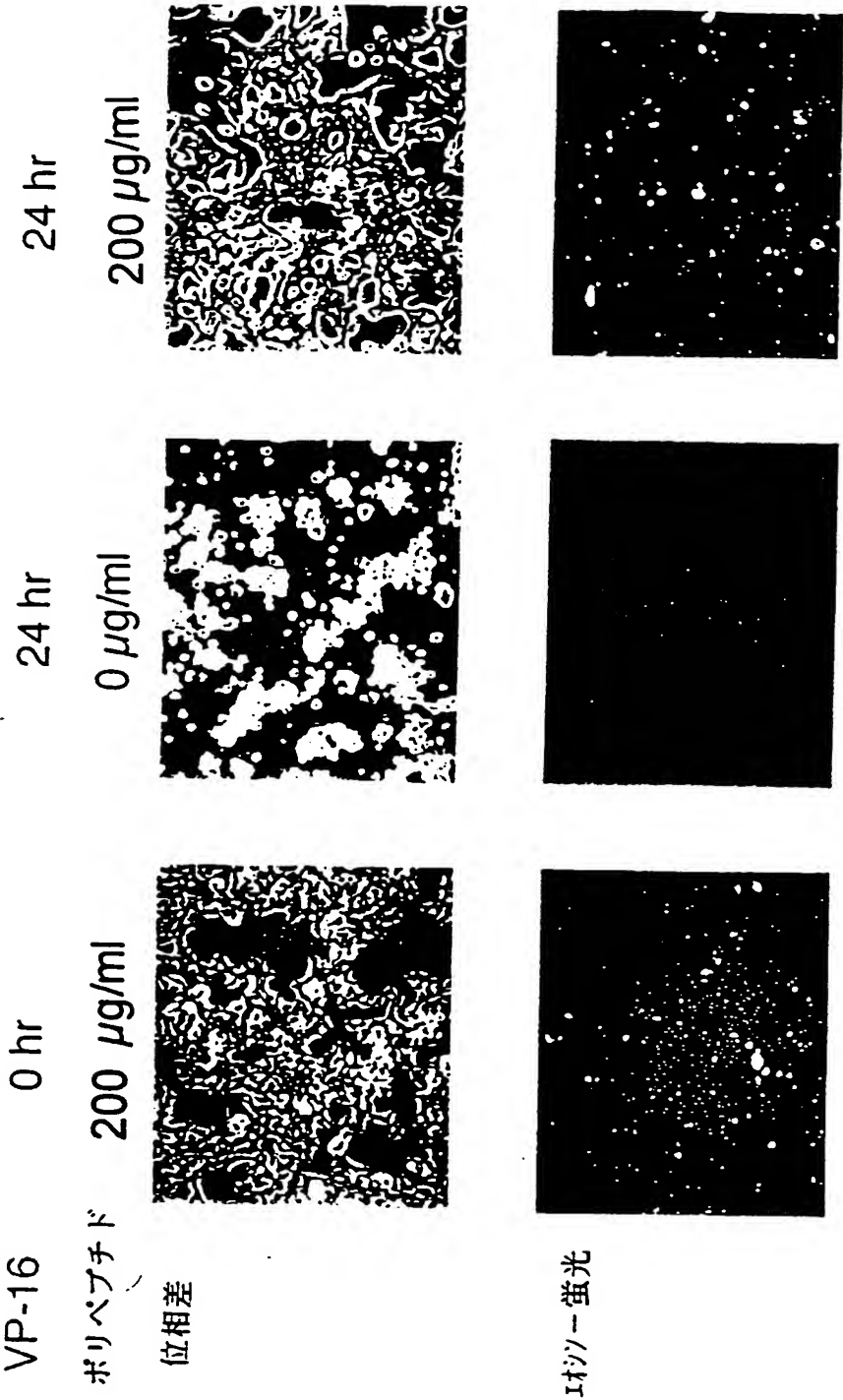
第 1 4 図



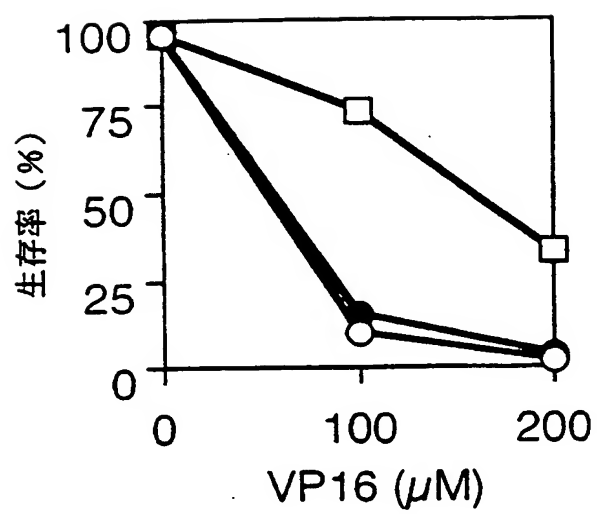
第 1 5 図



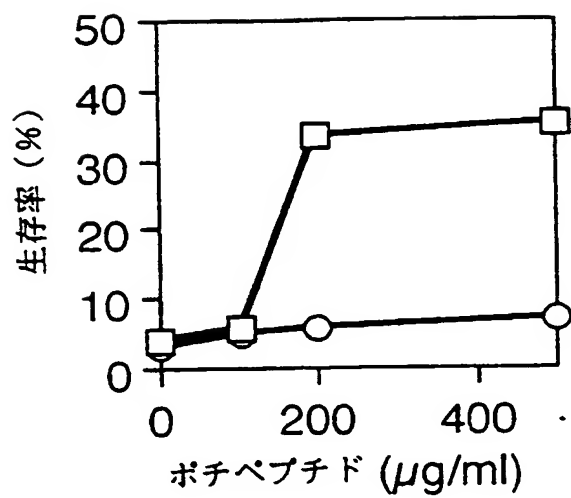
第 1 6 図



第 17 図



第 1 8 図



SEQUENCE LISTING

<110> SHIONOGI & CO., LTD.

<120> A BH4 fusion polypeptide

<130> 00-061-PCT

<150> JP 11-371449

<151> 1999-12-27

<160> 33

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Consensus sequence of BH4 domain conserved in anti-apoptotic Bcl-2 family proteins.

<220>

<223> Xaa at position 7, 10, and 11 can be any kinds of amino acid resid

ues.

<400> 1

Asp Asn Arg Glu Leu Val Xaa Asp Phe Xaa Xaa Tyr Lys Leu Ser Gln Lys

1

5

10

15

Gly Tyr Ser

20

<210> 2

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu

1

5

10

15

Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp

20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys

1 5 10 15

Gly Tyr Ser

20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Thr Arg Ala Leu Val Ala Asp Phe Val Gly Tyr Lys Leu Arg Gln

1 5 10 15

Lys Gly Tyr Val

20

<210> 5

<211> 86

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser Gln

1 5 10 15

Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe His Cys
20 25 30

Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Lys
35 40 45 50

Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala His Gln Asn Ser Gln Thr His Gln Ala Ser
55 60 65

Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Pro Arg Gly Asp Pro Thr Gly Pro Lys
70 75 80 85

Glu

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1

5

<210> 7

<211> 35

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Xaa at position 1 is eosin-conjugated cystein residue.

<220>

<223> Xaa at position 11 is bAla residue.

<400> 7

Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Thr Gly Tyr Asp Asn Arg

1

5

10

15

Glu Ile Val Met Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu

20

25

30

Trp

35

<210> 8

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Xaa at position 1 is eosin-conjugated cystein residue.

<220>

<223> Xaa at position 11 is bAla residue.

<400> 8

Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Ser Asn Arg Glu Leu Val

1

5

10

15

Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser

20

25

30

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 9

Asp Ile Glu Gly Phe Val Val Asp Tyr Phe Thr His Arg Ile Arg Gln

1

5

10

15

Asn Gly Met Glu

20

<210> 10

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Ser Gln Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys
1 5 10 15

Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser Trp Ser Gln Phe Ser Asp Val Glu Glu
20 25 30

Asn Arg Thr Glu Ala Pro Glu Gly Thr Glu Ser Glu Met Glu Thr Pro
35 40 45

Ser Ala Ile Asn Gly Asn Pro Ser Trp His Leu Ala Asp Ser Pro Ala
50 55 60

Val Asn Gly Ala Thr Ala His Ser Ser Ser Leu Asp Ala Arg Glu Val
65 70 75 80

Ile Pro Met Ala Ala Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu Ala Gly Asp Glu
85 90 95

Phe Glu Leu Arg Tyr Arg Arg Ala Phe Ser Asp Leu Thr Ser Gln Leu
100 105 110

His Ile Thr Pro Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu Gln Val Val Asn

115 120 125
Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe
130 135 140
Ser Phe Gly Gly Ala Leu Cys Val Glu Ser Val Asp Lys Glu Met Gln
145 150 155 160
Val Leu Val Ser Arg Ile Ala Ala Trp Met Ala Thr Tyr Leu Asn Asp
165 170 175
His Leu Glu Pro Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp Asp Thr Phe Val
180 185 190
Glu Leu Tyr Gly Asn Asn Ala Ala Ala Glu Ser Arg Lys Gly Gln Glu
195 200 205
Arg Phe Asn Arg Trp Phe Leu Thr Gly Met Thr Val Ala Gly Val Val
210 215 220
Leu Leu Gly Ser Leu Phe Ser Arg Lys
225 230

<210> 11

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed nucleotide for synthesizing a mutant bcl-x_L based on human bcl-x_L DNA sequence.

<400> 11

cggaattcat gtcttggagt cagtttagtg atgtggaaga gaacagg

47

<210> 12

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed nucleotide for synthesizing mutant bcl-x_L based on human bcl-x_L DNA sequence.

<400> 12

cggaattctg gtcatttccg actgaagagt gagccccag

38

<210> 13

<211> 636

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized DNA for mutant bcl-x L .

<221> CDS

<222> (1)..(636)

<400> 13

atg tct tgg agt cag ttt agt gat gtg gaa gag aac agg act gag gcc 48

Met Ser Trp Ser Gln Phe Ser Asp Val Glu Glu Asn Arg Thr Glu Ala

1

5

10

15

cca gaa ggg act gaa tcg gag atg gag acc ccc agt gcc atc aat ggc 96

Pro Glu Gly Thr Glu Ser Glu Met Glu Thr Pro Ser Ala Ile Asn Gly

20

25

30

aac cca tcc tgg cac ctg gca gac agc ccc gcg gtg aat gga gcc act 144

Asn Pro Ser Trp His Leu Ala Asp Ser Pro Ala Val Asn Gly Ala Thr

35

40

45

gcg cac agc agc agt ttg gat gcc cgg gag gtg atc ccc atg gca gca 192

Ala His Ser Ser Ser Leu Asp Ala Arg Glu Val Ile Pro Met Ala Ala

50

55

60

gta aag caa gcg ctg agg gag gca ggc gac gag ttt gaa ctg cgg tac 240

Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu Ala Gly Asp Glu Phe Glu Leu Arg Tyr

65

70

75

80

cgg cgg gca ttc agt gac ctg aca tcc cag ctc cac atc acc cca ggg 288
 Arg Arg Ala Phe Ser Asp Leu Thr Ser Gln Leu His Ile Thr Pro Gly

85

90

95

aca gca tat cag agc ttt gaa cag gta gtg aat gaa ctc ttc cgg gat 336
 Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu Gln Val Val Asn Glu Leu Phe Arg Asp

100

105

110

ggg gta aac tgg ggt cgc att gtg gcc ttt ttc tcc ttc ggc ggg gca 384
 Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Ser Phe Gly Gly Ala

115

120

125

ctg tgc gtg gaa agc gta gac aag gag atg cag gta ttg gtg agt cgg 432
 Leu Cys Val Glu Ser Val Asp Lys Glu Met Gln Val Leu Val Ser Arg

130

135

140

atc gca gct tgg atg gcc act tac ctg aat gac cac cta gag cct tgg 480
 Ile Ala Ala Trp Met Ala Thr Tyr Leu Asn Asp His Leu Glu Pro Trp

145

150

155

160

atc cag gag aac ggc ggc tgg gat act ttt gtg gaa ctc tat ggg aac 528
 Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp Asp Thr Phe Val Glu Leu Tyr Gly Asn

165

170

175

aat gca gca gcc gag agc cga aag ggc cag gaa cgc ttc aac cgc tgg 576

Asn Ala Ala Ala Glu Ser Arg Lys Gly Gln Glu Arg Phe Asn Arg Trp

180

185

190

ttc ctg acg ggc atg act gtg gcc ggc gtg gtt ctg ctg ggc tca ctc 624

Phe Leu Thr Gly Met Thr Val Ala Gly Val Val Leu Leu Gly Ser Leu

195

200

205

ttc agt cgg aaa

636

Phe Ser Arg Lys

210

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide for mutant Bcl-x_L BH4.

<400> 14

Ser Asn Arg Glu Val Phe Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys

1

5

10

15

Gly Tyr Ser

20

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide for mutant Bcl-x_L BH4.

<400> 15

Ser Asn Arg Glu Gly Gly Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys

1

5

10

15

Gly Tyr Ser

20

<210> 16

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide for mutant Bcl-x_L BH4.

<400> 16

Ser Asn Arg Glu Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr

1

5

10

15

Ser

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide for mutant Bcl-x_L BH4.

<400> 17

Ser Asn Arg Glu Leu Val Gly Gly Phe Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys

1

5

10

15

Gly Tyr Ser

20

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide for mutant Bcl-x_L BH4.

<400> 18

Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Gly Gly Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys

1

5

10

15

Gly Tyr Ser

20

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide for mutant Bcl-x_L BH4.

<400> 19

Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr

1

5

10

15

Ser

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide for mutant Bcl-x_L BH4.

<400> 20

Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Gly Phe Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys

1

5

10

15

Gly Tyr Ser

20

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide for mutant Bcl-x_L BH4.

<400> 21

Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys Trp Ser Gln Lys

1

5

10

15

Gly Tyr Ser

20

<210> 22

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Val Ala Gln Asp Thr Glu Glu Val Phe Arg Ser Tyr Val Phe Tyr Arg His

1

5

10

15

Gln Gln Glu Gln Glu Ala Glu

20

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide for BH4 fusion peptide

<220>

<223> Xaa at position 1 is eosin-conjugated cystein residue.

<400> 23

Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1

5

10

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Human T lymphotropic virus

<400> 24

Lys Thr Arg Arg Arg Pro Arg Arg Ser Gln Arg Lys Arg

1

5

10

<210> 25

<211> 16

<212> PRT

<213> Human T lymphotropic virus

<400> 25

Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg Trp Arg Glu Arg Gln Arg

1

5

10

15

<210> 26

<211> 301

<212> PRT

<213> herpes simplex virus type 1

<400> 26

Met Thr Ser Arg Arg Ser Val Lys Ser Gly Pro Arg Glu Val Pro Arg

1

5

10

15

Asp Glu Tyr Glu Asp Leu Tyr Tyr Thr Pro Ser Ser Gly Met Ala Ser
20 25 30

Pro Asp Ser Pro Pro Asp Thr Ser Arg Arg Gly Ala Leu Gln Thr Arg
35 40 45

Ser Arg Gln Arg Gly Glu Val Arg Phe Val Gln Tyr Asp Glu Ser Asp
50 55 60

Tyr Ala Leu Tyr Gly Gly Ser Ser Ser Glu Asp Asp Glu His Pro Glu
65 70 75 80

Val Pro Arg Thr Arg Arg Pro Val Ser Gly Ala Val Leu Ser Gly Pro
85 90 95

Gly Pro Ala Arg Ala Pro Pro Pro Pro Ala Gly Ser Gly Gly Ala Gly
100 105 110

Arg Thr Pro Thr Thr Ala Pro Arg Ala Pro Arg Thr Gln Arg Val Ala
115 120 125

Thr Lys Ala Pro Ala Ala Pro Ala Ala Glu Thr Thr Arg Gly Arg Lys
130 135 140

Ser Ala Gln Pro Glu Ser Ala Ala Leu Pro Asp Ala Pro Ala Ser Thr
145 150 155 160

Ala Pro Thr Arg Ser Lys Thr Pro Ala Gln Gly Leu Ala Arg Lys Leu

165

170

175

His Phe Ser Thr Ala Pro Pro Asn Pro Asp Ala Pro Trp Thr Pro Arg

180

185

190

Val Ala Gly Phe Asn Lys Arg Val Phe Cys Ala Ala Val Gly Arg Leu

195

200

205

Ala Ala Met His Ala Arg Met Ala Ala Val Gln Leu Trp Asp Met Ser

210

215

220

Arg Pro Arg Thr Asp Glu Asp Leu Asn Glu Leu Leu Gly Ile Thr Thr

225

230

235

240

Ile Arg Val Thr Val Cys Glu Gly Lys Asn Leu Leu Gln Arg Ala Asn

245

250

255

Glu Leu Val Asn Pro Asp Val Val Gln Asp Val Asp Ala Ala Thr Ala

260

265

270

Thr Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Arg Pro Thr Glu Arg Pro Arg Ala

275

280

285

Pro Ala Arg Ser Ala Ser Arg Pro Arg Arg Pro Val Glu

290

295

300

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> Drosophila

<400> 27

Arg Gln Ile Lys Ile Phe Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Phe Lys Lys

1

5

10

15

<210> 28

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide for BH4 fusion peptide

<220>

<223> Xaa at position 10 is bAla residue.

<400> 28

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Ser Asn Arg Glu Leu Val

1

5

10

15

Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser

20

25

30

<210> 29

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide for BH4 fusion peptide

<220>

<223> Xaa at position 10 is bAla residue.

<400> 29

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Ser Asn Arg Asp Leu Val

1

5

10

15

Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser

20

25

30

<210> 30

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide for BH4 fusion peptide

<400> 30

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Ser Asn Arg Glu Leu Val

1

5

10

15

Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser

20

25

30

<210> 31

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide for BH4 fusion peptide

<400> 31

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Ser Asn Arg Asp Leu Val

1

5

10

15

Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser

20

25

30

<210> 32

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide for BH4 fusion peptide

<400> 32

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Ser Asn Arg Glu Leu Val

1 5 10 15

Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser

20 25 30

<210> 33

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide for BH4 fusion peptide

<400> 33

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Ser Asn Arg Asp Leu Val

1 5 10 15

Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser

20 25 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09274

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K 14/47, C12N 15/12, A61K 38/17, A61P 9/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K 14/47, C12N 15/12, A61K 38/17, A61P 9/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/EMBL/GenBank

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	S. Shimizu et al., "Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC" Nature, Vol.399 (June 1999) pp.483-487	1-10,13-14
A	Y. Tsujimoto et al., "Involvement of the bcl-2 Gene in Human Follicular Lymphoma" Science, Vol.228 (1985) pp.1440-1443	1-10,13-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 April, 2001 (13.04.01)Date of mailing of the international search report
22 May, 2001 (22.05.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09274

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11,12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 11 and 12 involve inventions which pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C07K 14/47, C12N 15/12, A61K 38/17, A61P 9/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C07K 14/47, C12N 15/12, A61K 38/17, A61P 9/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/EMBL/GenBank

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	S. Shimizu et al. "Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC" Nature, 第399巻 (1999, June) p. 483-487	1-10, 13-14
A	Y. Tsujimoto et al. "Involvement of the bcl-2 Gene in Human Follicular Lymphoma" Science, 第228巻 (1985) p. 1440-1443	1-10, 13-14

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 04. 01

国際調査報告の発送日

22.05.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加藤浩



4B

9050

電話番号 03-3581-1101. 内線 3448

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 11, 12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲11及び12にはヒトの治療方法の発明が含まれている。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。